АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XVIII. ВЫП. 6

НОЯБРЬ—ДЕКАБРЬ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1949

МИКРОБИОЛОГИЯ

Редактор чл.-корр. АН СССР А. А. Имшенецкий

Секретарь Я. И. Раутенштейн

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, Н. Д. Иерусалимский, Н. А. Красильников, В. Н. Шапошников

ПО ВСЕМ ВОПРОСАМ ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ „МИКРОБИОЛОГИЯ" ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ: МОСКВА, Б. ЧЕРКАССКИЙ ПЕР., 2, КОНТОРА „АКАДЕМКНИГА".

Рукописи направлять по адресу:
Москва, Волхонка, 14, Издательство Академии Наук СССР,
редакция журнала «Микробиология»

МИКРООРГАНИЗМЫ И ОБРАЗОВАНИЕ ГУМУСА

К. И. Рудаков

По вопросу о природе и путях образования гумуса накоплен значительный, но противоречивый материал.

Микроорганизмам в этом процессе отводится все большая и большая роль. Некоторые исследователи считают даже микробную массу основной формой гумуса. По воззрениям же большинства, гумус является растительной массой, измененной жизнедеятельностью микробов, растительными энзимами и вторичными химическими реакциями.

Некоторые исследователи основное значение в образовании гумуса придают растворимым продуктам, образующимся за счет микробного разложения растительных остатков. Другая часть исследователей центральное место отводит более устойчивым против разложения составным частям растительных тканей.

В более общей форме взгляд на природу гумуса сформулирован в последнее время Тюриным [27], который рассматривает гумус как сложный комплекс, формирующийся в результате процессов окисления, полимеризации, уплотнения или взаимной конденсации из растительных и животных органических веществ, а также вторичных продуктов, образовавшихся из них в результате жизнедеятельности микроорганизмов (продукты распада и микробного синтеза).

Сходную точку зрения развивает и Мишустин [16], который полагает, что гумус может образоваться из самых различных природных растительных соединений. Эти соединения первоначально подвергаются ферментативному гидролизу (за счет действия микробных и растительных ферментов); продукты их распада в условиях пониженной микробной деятельности взаимно реагируют, превращаются в гуминовые вещества.

Основной причиной, породившей все затруднения в решении проблемы гумуса, было то, что гумус изучался как таковой, как «вещь в себе». Методологически единственным путем продвинуть вперед изучение проблемы гумуса — это отказаться от эмпирических анализов и поставить во всю широту изучение гумуса как «вещи для нас», т. е. познание его как фактора почвенного плодородия.

Блестящее начало такому подходу положил Вильямс [1, 2]; он со всей присущей ему остротой мысли поставил вопрос об активном перегное как основном факторе почвенного плодородия.

Основной формой, определяющей собой плодородие почвы, Вильямс считает деятельный перегной, количество которого может достигать 1% от веса почвы; деятельный перегной образуется в анаэробных условиях анаэробными бактериями и представлен в основном ульминовой кислотой (а также ульмином и солями ульминовой кислоты). Помимо ульминовой кислоты, деятельный перегной может быть представлен также гуминовой кислотой (гумином), образуемой аэробными бактериями. Гуминовая кислота может накопляться в почве лишь в ничтожном количестве.

Ульминовая кислота, продуцируемая анаэробными бактериями, обладает высоким содержанием азота, сложным молекулярным строением и токсична в отношении бактерий, ее создающих. Исходя из этих призна-

ков, Вильямс отождествляет ульминовую кислоту, а следовательно, и активный перегной с экзоэнзимами анаэробных бактерий. Ульминовая кислота выделяется бактериальной клеткой в молекулярно растворимой форме, легко дает соли; освобождаясь из солевой формы, дает коллоидные растворы. Под влиянием морозов денатурируется, переходя в ульмин.

Коллоидные растворы ульминовой кислоты обладают клеящими свойствами, ульмин — цементирующими. Присутствие ульмина определяет прочность структурных агрегатов почвы.

Отсутствие единого взгляда на процессы образования гумуса естественно определяет собой и неопределенность в вопросе о химизме гумуса.

Наиболее характерная особенность гумуса, действительно позволяющая выделить гумусовые вещества в самостоятельный тип природных тел, подмечена лишь в последнее время. Эта особенность сводится к тому, что структура гумусовых веществ более стабильна в данных термодинамических условиях по сравнению с теми природными веществами, из которых они образовались. Эта точка зрения, впервые сформулированная Вильямсом, в последние два десятилетия развита Орловым [18], Тюриным [27].

Мы считаем возможным называть гумусом те органо-минеральные почвенные вещества, структура которых более стабильна в данных термодинамических условиях, нежели структура тех природных органических веществ, из которых они образовались. Так как формирование гумуса может находиться на различных стадиях, можно различать:

1. Прогумусовые вещества. Первичные образования за счет которых идет дальнейшее формирование гумуса; это вещества, способные склеивать почвенные частицы.

2. Активный гумус. Вещества, цементирующие почвенные комочки, придающие им прочность. При распаде данной формы гумуса легко образуются питательные для растений вещества.

3. Стабильный гумус. Вещества, цементирующие почвенные комочки, но уже труднее разлагаемые и поэтому не принимающие значительного участия в корневом питании растений.

4. Инактивный гумус. Вещества, обладающие стабильностью, но не играющие роли ни в создании прочной структуры почвенных агрегатов, ни в корневом питании растений в силу их трудной минерализуемости.

Образование гумуса из растительных остатков при их разрушении микроорганизмами

Растительные остатки, попадающие в почву после отмирания растения, весьма неоднородны по химическому составу и по прочности. В первом приближении составные части растительного остатка могут быть распределены на три группы:

1) фракция воднорастворимых и легко разлагаемых микроорганизмами веществ;

2) фракция не растворимых, но биологически легко гидролизуемых веществ;

3) фракция биологически устойчивых веществ.

Чтобы осветить вопрос об образовании гумуса в процессе разложения растительного остатка, мы рассмотрим роль каждой фракции.

1. Образование гумуса за счет воднорастворимых органических веществ

В составе воднорастворимой фракции мы находим, помимо минеральных веществ, моно- и дисахариды, органические кислоты, амино-

кислоты и некоторые белковые вещества. Их существование весьма эфемерно; они быстро потребляются разнообразными почвенными микроорганизмами, превращаясь отчасти в составные части микробной массы. Однако поскольку воднорастворимая фракция может составлять 10—15% от общего количества веса растительной массы, вопрос о роли этих веществ в образовании гумуса может приобрести известную значимость.

На возможность закрепления некоторой части воднорастворимых веществ в форме гумуса указывали Леваковский [15], Слезкин [21] и в особенности Кравков [10, 11, 12, 13]. В противоположность Кравкову, Гельцер [5] категорически отрицает непосредственное участие воднорастворимых веществ в образовании гумуса; она считает, что воднорастворимые органические вещества являются лишь материалом, из которого почвенные микробы синтезируют перегной.

Американские исследователи также за последние годы уделяют большое внимание легко подвижным органическим веществам, доказывая, что за счет последних почвенные микроорганизмы могут продуцировать новые вещества, агрегирующие почву (Martin и Andersen [35], Mc Henry и Russel [38]).

В общем, в настоящее время вырисовывается та точка зрения, что воднорастворимые органические вещества непосредственно превращаться в гумус не могут. Они служат лишь материалом, за счет которого развивается микробная масса.

2. Биологически легко гидролизуемая фракция

Наряду с воднорастворимыми веществами мы находим в составе растительного остатка вторую фракцию, составленную из веществ, переходящих в раствор в естественной обстановке лишь в результате гидролиза, вызываемого отчасти растительными, а в основном микробными эктоферментами.

В состав этой фракции мы находим:

1) полисахариды: крахмал, клетчатка, пентозаны;
2) белки, протеиды, пектиновые вещества;
3) гемицеллюлозы;
4) жиры.

Полисахариды

1. Крахмал. Продуктами гидролиза крахмала являются растворимые углеводы. Последние быстро потребляются самыми разнообразными бактериями. В анаэробных условиях за счет углеводов могут образоваться органические кислоты. Существование их, однако, может быть весьма кратковременным, поскольку не той, так другой микробной формой они окисляются до конечных продуктов.

Нет никаких оснований считать крахмал или продукты его распада участвующим в образовании гумуса. Допустить возможность конденсирования углеводов с аминокислотами, в результате чего могут образоваться более стойкие комплексы (типа описанных Maillard [34]) ввиду быстрого потребления углеводов массой микробов,— нет оснований.

2. Клетчатка. Занимает виднейшее место в составе растительных тканей; в процентном отношении ее содержание лежит в пределах 20—50. Еще сравнительно недавно целлюлоза считалась важнейшим, если не единственным источником гумуса (Czapek [30]). Однако за последние два десятилетия этот взгляд подвергнут коренному пересмотру. Работы ряда исследователей (Кононова [7], Waksman [44, 45, 46, 48]) показали, что как в аэробных, так и анаэробных условиях клетчатка разлагается микробами весьма глубоко.

Как показали исследователи Ремизова [19], целлюлоза как таковая не обнаруживается аналитически в большинстве почв СССР.

Это также служит указанием на легкую ее биологическую гидролизуемость. Интересное исключение составляют черноземы Западной Сибири. В составе органического вещества этих почв Ремизов обнаружил от 7 до 14% целлюлозы.

Данные Тюрина [25] и его сотрудников [26] в отношении целлюлозы несколько отличаются от полученных Ремизовым. Целлюлоза была им найдена в тундровых, подзолистых, лесостепных и черноземных почвах.

Если роль самой целлюлозы и продуктов ее распада с большой основательностью может отрицаться, то роль целлюлозных бактерий, синтезирующих большое количество протеинов своей плазмы и клеящих веществ типа гемицеллюлозы, заслуживает самого пристального внимания.

С этой точки зрения интересны данные Гельцер, Беляковой и Чернышевой [3], которые подвергли компостированию почвенные образцы с целлюлозой (и другими веществами).

Эти опыты показали, что продукты, синтезируемые целлюлозными бактериями при разложении клетчатки, обладают значительной агрегирующей способностью, но не создают прочных структурных элементов. По истечении некоторого времени новообразовавшиеся в условиях опыта отдельные структурные элементы разрушились.

Прямым подтверждением этого являются опыты Мишустина и Громыко [16] по проверке стабильности структуры, создаваемой Cytophaga Hutch.

Кононова [7], проведя широкие исследования, вновь выдвигает на первый план целлюлозу и целлюлозных миксобактерий как агентов гумусообразования. По ее материалам, продукты распада целлюлозы, окисленные пероксидазными ферментами, продуцируемыми целлюлозными миксобактериями, дают хиноноподобные соединения. Последние, комплексируясь с микробными протеинами (полипептидами), образуют гумусовые структуры, близкие лигнопротеиновому комплексу Ваксмана.

3. Пентозаны и гексозаны. Пентозы входят в состав растительных клеточных стенок, составляя весьма значительный процент сухого вещества растения (от 15 до 33).

Наряду с чистыми пентозанами в растениях обычно находят комплексные соединения пентозанов и гексозанов. Первыми продуктами гидролиза пентозанов и гексозанов будут соответствующие пентозы и гексозы, которые быстро потребляются различными микроорганизмами, грибами и бактериями, превращающими их в конечном счете в CO_2 и воду. Разложение пентозанов под воздействием микроорганизмов идет с разными скоростями. Так, например, ксилан разлагается примерно с той же скоростью, как клетчатка; галактан же — значительно медленнее. В общем же данные вещества не отличаются значительной стабильностью и относительно легко разрушаются микроорганизмами.

Заслуживает внимания, что при детализированном анализе органического вещества различных почв часто констатируется весьма большое содержание пентозанов, что говорит как бы об их значительной устойчивости. Однако данный вывод не подтверждается прямыми экспериментами.

Высокое содержание пентозанов в почвах проще всего объясняется дефективностью аналитической методики. Дело в том, что пентозаны определяют по фурфуролу, выделяющемуся при кипячении с 12% соляной кислотой; фурфурол же дает при такой обработке не только пентозаны, но и уроновые кислоты, их комплексы (полиуроиды), а также пентозы нуклеиновых кислот.

Возможно, конечно, вторичное накопление пентозанов как продуктов, синтезированных в результате деятельности микроорганизмов. Мы полагаем, что пентозаны непосредственного участия в образовании гумуса принимать не могут. Лишь микробная масса, развивавшаяся за счет пентозанов, может оказаться причиной склеивания почвенных минеральных частиц, а впоследствии может быть и цементирования.

Белки, протеиды и пектиновые вещества

Между молодыми клеточными стенками образуется так называемая срединная пластинка, состоящая из пектиновых веществ, отчасти гемицеллюлоз. Состав пектиновых веществ межклеточного вещества различных растений неоднороден. В типичных случаях они представляют собой протопектин — сложную молекулу, составленную из галактозы, арабинозы, метилового спирта, галактуроновой кислоты, солей Mg и Ca.

Протопектин не растворим в воде, но легко превращается в растворимый пектин под воздействием фермента протопектиназы. Такова, например, роль протопектиназы в возникновении мокрых гнилей растений (Шишелова [28]). Последний разлагается другим ферментным комплексом — «пектиназой» — на составные части. При ферментативном гидролизе пектина образуются сахара (глюкозы и пентозы), галактуроновая кислота, уксусная кислота и метанол.

Из числа этих продуктов гидролиза лишь галактуроновая кислота, как и вообще уроновые кислоты, является биологически более устойчивым соединением.

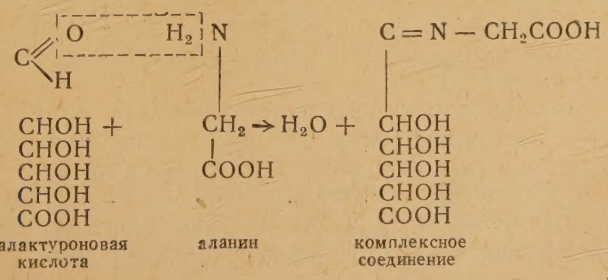
Это может быть иллюстрировано данными Корсаковой и Никитиной [8] и других исследователей.

По своей устойчивости к биологическому разложению уроновые кислоты занимают промежуточное положение между лигнином и целлюлозой, приближаясь более к первому.

По данным ряда исследователей, уроновые кислоты могут составлять от 13 до 32% органического вещества почвы (Тюрин, Кононова [25] Shorey и Martin [43]).

Если принять во внимание большое содержание уроновых кислот, констатируемое в гумусе различных почв, и одновременно довольно высокую растворимость этих кислот, возникает вопрос о причинах, вызывающих их закрепление в почве.

В поисках ответа на этот вопрос мы, развивая высказанную вскользь Ваксманом и Реуцером [49] мысль, предположили, что уроновые кислоты, в частности галактуроновая, могут вступать во взаимодействие с протеинами, давая устойчивые (нерастворимые) комплексы. Известно, что сложное производное галактуроновой кислоты — гиалуроновая кислота (глюкуроновая кислота + N-ацетилглюкозамин), находясь в водном растворе вместе с белком, может при определенном значении pH давать или муть, или плотный сгусток (Robertson, Raper и Bauer [40]). Эта реакция может протекать по схеме, предложенной Майаром для реакции между сахарами и аминокислотами — получение искусственной гуминовой кислоты:



В почве содержится большое количество белка в виде микробной массы, отчасти продуктов ее автолиза. Не имеет ли место взаимодействие этого микробного белка с уроновыми кислотами с образованием более устойчивых соединений? Для проверки этого предположения мы провели некоторые эксперименты, результаты которых здесь излагаются.

Белковая масса микробов получалась путем снятия колоний с питательных сред на чашках Петри. Из нее были изготовлены густые водные суспензии. Часть этих суспензий выдерживалась 24—28 часов в термостате при 52—55° для автолизирования. Часть шла в опыт немедленно по изготовлении. Микробные суспензии (как свежие, так и автолизированные) подвергались обработке растворами органических кислот (уксусной, молочной, глюконовой, галактуроновой и т. д.) и их солей в различных концентрациях (добавление по каплям). Продолжительность выдержки 1 сутки при 36°. При такой обработке в ряде случаев как из свежих суспензий, так и из автолизатов были получены хлопьевидные или гелеобразные осадки различной вязкости. Более заметное образование геля отмечалось при взаимодействии уроновых кислот. Уксусная и молочная кислоты давали появление весьма слабой мути.

Получив при реакции белков и уроновых кислот клеящие гели (в дальнейшем мы будем называть их уронопротеидами), мы поставили вопрос об их цементирующих свойствах, о способности противостоять размывающему действию воды.

С целью выяснения этого вопроса смесь кварцевого песка и каолина была обработана препаратом уронопротеида. Часть полученной массы была высушена, часть оставлена во влажном состоянии. Высушенная и пастообразно-влажная массы были затем гранулированы и подвергнуты обработке водой. Прочность гранул оказалась минимальной.

В следующем опыте песок с каолином был смешан с микробной массой и микробным автолизатом. Полученная масса была гранулирована, слегка подсушена на воздухе и затем обработана раствором галактуроновой кислоты. Приготовленные таким образом гранулы также не обладали прочностью.

В третьем опыте приготовленные двумя предыдущими способами гранулы перед испытанием на прочность были подвергнуты дополнительной обработке.

Часть гранул была помещена на 24 часа в камеру, охлаждаемую «сухим льдом»; другая часть после подсушивания — обработана раствором $CaCl_2$ (0,5 г $CaCl_2$ на 100 г каолино-кварцевой смеси).

Результаты, полученные при испытании прочности таких гранул, показали, что под влиянием низкой температуры и кальция гранулы приобрели прочность.

Последняя серия опытов была произведена для решения вопросов об устойчивости гранул, цементированных уронопротеидами, к микробному воздействию.

Приготовленные по вышеописанному способу водопрочные гранулы были помещены в пробирки. В половине пробирок гранулы были смочены водой до полной влагоемкости; пробирки закрыты каучуковыми пробками, таким образом были созданы анаэробные условия. Влажность гранул в остальных пробирках была доведена до 50% от полной влагоемкости, и пробирки закрыты ватными пробками (аэробные условия). Обе серии инфицированы почвенной взвесью и помещены в термостат при 26°.

Совершенно аналогичные опыты были заложены с гранулами, пропитанными глюкуроновой кислотой, бактериальной массой и микробным автолизатом. Через один-два и три месяца проведены анализы на прочность почвенных агрегатов.

Эти опыты показали, что при взаимодействии микробной массы (а также автолизатов) с уроновыми кислотами могут образовываться клеящие вещества, превращающиеся при замораживании и обработке Са-солями в водопрочные комплексы, способные противостоять действию микробов. В анаэробных условиях образующиеся структурные отдельности более прочны, чем при доступе воздуха (Рудаков [20]).

Полученные результаты выдвинули перед нами вопрос: не являются ли уронопротеидные комплексы теми соединениями, которые в природных условиях цементируют почвенные агрегаты, т. е. активным перегноем. По Вильямсу [2], разработавшему учение об активном перегное, его природе и путях образования в почве, активный перегной (ульминовая и отчасти гуминовая кислоты) являются продуктом синтетической деятельности анаэробных (ульминовая кислота) и аэробных (гуминовая кислота) бактерий. Несомненно, что и микробный протеин и уроновые кислоты могут отвечать этому определению, т. е. появиться в почве в результате синтетической деятельности бактерий.

Для детального изучения вопроса о путях образования уроновых кислот в почве, о возможных условиях формирования уронопротеидных комплексов в ротации травопольных севооборотов и вопроса о бактериях, принимающих участие в этих процессах, мы привели серию соответствующих исследований. Их результаты, а также данные о значении пектиназного ферментного комплекса и о бактериях, участвующих в его образовании, составляют предмет наших следующих сообщений.

Гемицеллюлозы

На гемицеллюлозы, независимо от их происхождения, уже давно обращено внимание, как на источник гумуса (Aschan [29]).

Гемицеллюлозы, как правило, не растворимы в воде, но растворяются в щелочах (4—10%) и осаждаются кислотами. Они обладают большой клеящей способностью и могут играть роль в процессе первичного формирования почвенных макроагрегатов.

Не исключено, что гемицеллюлозы, подобно уронидам, могут вступать во взаимодействие с протеинами, давая клеящие комплексы (Martin [36, 37]).

К этому следует добавить, что в равной мере в процессе образования перегнойных веществ могут принимать участие и гемицеллюлозы, синтезируемые микроорганизмами.

Жиры и жироподобные вещества

Жиры, попадающие в почву с растительными остатками, сравнительно легко гидролизуются липолитическими ферментами, с образованием глицерина и жирных кислот. Глицерин, повидимому, быстро потребляется микроорганизмами. Жирные кислоты участвуют в образовании битумов.

3. Образование гумусовых веществ за счет биологических устойчивых фракций

По мере хода разложения растительных остатков состав органической массы претерпевает существенные изменения. Содержание воднорастворимых и легкогидролизуемых веществ резко уменьшается, зато процентно возрастает содержание биологически устойчивых соединений.

Наиболее биологически устойчивыми составными частями растительного остатка являются лигнин, кутины, воска, смолы, углеводороды. Их, и в особенности лигнин, многие исследователи считают основным материалом, из которого образуется гумус, а в определенных условиях — угли и нефти.

Лигнин

Большое значение в образовании гумуса придается лигнину. На роль лигнина указывали Fischer [31], Fuchs [32, 33] и другие. Waksman и Iyer [48] выдвинули теорию лигнопротеинового комплекса как ядра

почвенного гумуса. По Ваксману и Айеру основная масса гумуса составлена из продуктов конденсации между лигнином и его дериватами, с одной стороны, и протеином, преимущественно микробного происхождения,— с другой. Искусственно приготовленные лигнопротеиновые комплексы (смеси щелочного раствора лигнина и протеина, осажденные кислотами, а также солями двух- и трехвалентных металлов, обладали всеми основными свойствами «гуминовой кислоты» гумуса.

Взгляды, развиваемые Ваксманом, вызвали значительный интерес, но полного признания не получили (Тюрин [25]).

Ваксман допускает, что гумус образуется при непосредственном взаимодействии лигнина с протеином по следующей схеме:

$$C_{52}H_{16}O_{10}.COOH\,(OH)_4.\ CO + H_2NRCOOH \rightarrow$$
$$\rightarrow C_{52}H_{46}O_6.\ \ COOH\,(OH)_4.\ C = NRCOOH + H_2O$$

Для допущения подобной реакции, по нашему мнению, достаточных оснований не имеется. В самом деле, если смешать (в водном растворе) какой-либо препарат лигнина с протеином, ничего похожего на эту реакцию не произойдет. Мы будем иметь смесь препарата лигнина с протеином и только. Ваксман готовит лигнопротеиновые комплексы, смешивая щелочные растворы лигнина, нагретые в течение 5 часов при 120°, с протеином. Между тем известно (Schrader [41]), что лигнин в присутствии щелочей сильно поглощает кислород, при этом образуются растворимые в щелочах соединения наряду с некоторыми органическими кислотами. Особенно энергично идет поглощение кислорода при повышенной температуре и давлении.

Таким образом, есть все основания считать, что в опытах Ваксмана не лигнин давал комплексные соединения с протеином, а искусственно полученные продукты его расщепления.

При разложении растительных остатков в почве лигнин, очевидно, постепенно подвергается механическому изменению, перерабатывается дождевыми червями и другими агентами, приобретает темную окраску и превращается в анаэробных условиях в аморфный, инертный перегной. В аэробных же условиях, при достаточной щелочности среды, он подвергается окислению, частично минерализуется, а частично вовлекается в новые превращения. Продукты окислительного распада лигнина могут в известной мере и в естественной обстановке служить материалом для образования гумуса.

Воска и смолы

Воска и смолы — наиболее стойкие природные растительные вещества, дающие начало битумам; они могут после измельчения массы механически примешиваться к массе инертного гумуса, влияя на итоги суммарного анализа.

Стадников [23] считает, например, гумусовые вещества промежуточными продуктами при образовании угля и нефтей, а гумус — средством накопления таких устойчивых при разложении веществ, как воск, углеродные смолы, стерины, кутины, жирные кислоты и т. д.

Образование гумуса за счет микробной массы

Уже давно многие исследователи отмечали роль микробной массы как материала для образования перегнойных веществ (Костычев [9], Schreiner и Schorey [42], Трусов [24], Сорокина и Тягны-Рядно [22]). Данное предположение приобрело особый интерес в связи с развитием учения о микрофлоре ризосферы растений.

Гельцер [3, 4] полагает, что «настоящей гуминовой кислотой нужно считать те вновь синтезированные бактериальной микрофлорой органические коллоидальные соединения, которые обладают способностью необратимо закрепляться в почве, образуя прочные органо-минеральные соединения». Основным материалом, за счет которого развивается синтетическая деятельность бактерий и образуется перегной, Гельцер считает легко гидролизуемые растительные вещества (белок, клетчатка), а также грибной автолизат.

Канивец [6], в отличие от Гельцер, считает основным фактором прочной структуры почвенные грибки, в особенности Trichoderma lignorum.

Вопрос о бактериальной массе как деятельном перегное был подвергнут детальному рассмотрению Мишустиным. Анализируя в своем кратком обзоре работы Гельцер и Канивец, он приходит к заключению, что попытки Гельцер, а также в ряде случаев Канивец, идентифицировать содержимое микробной клетки с перегнойными веществами можно считать недоказанным.

Мишустин [16, 17] полагает, что микроорганизмы, развивающиеся около корней или разлагающихся растительных остатков, вызывают цементирование почвы, пронизывая ее мицелием и пропитывая различными, более или менее легко разлагаемыми веществами. Возникающая таким образом структура, как показывает Мишустин, является весьма лабильной. В работе (совместно с Громыко [16]) он экспериментально показывает, что при развитии в почве грибов и актиномицетов, а также за счет бактериальных слизей количество макроагрегатов быстро возрастает. Однако эти агрегаты не обладают достаточной прочностью и легко распадаются под влиянием жизнедеятельности бактерий и автолитических процессов. Прочная структура возникает, по мнению Мишустина, лишь постепенно, благодаря превращению первичных мобильных веществ, созданных микроорганизмами в истинные гумусовые вещества. Вопроса о механизме этого превращения автор не затрагивает.

Исходя из разобранного материала, а также некоторых собственных данных, мы можем заключить, что микробная масса обладает, пожалуй, только одним свойством — клеящей способностью. Для признания же ее непосредственным носителем прочности структуры почвенного комочка никаких оснований не имеется.

Выводы

1. Наибольший практический интерес представляет та форма гумуса, которая была названа Вильямсом «активным перегноем».

2. Исходя из ряда соображений, а также экспериментальных данных, можно полагать, что активный гумус образуется в почве из фракции не растворимых, но биологически легкогидролизуемых веществ. Особое значение автор склонен отвести уроновым кислотам, получающимся при распаде пектиновых веществ.

3. Образование «активного гумуса» должно протекать в значительной мере вследствие реакции конденсации между уроновыми кислотами и веществами, имеющими свободную аминную группу (белки и продукты их распада).

4. Активный гумус способствует созданию эластичной прочной структуры почвы лишь при наличии в среде кальция и при денатурирующем действии низкой температуры.

Всесоюзный институт
сельскохозяйственной микробиологии
Москва

Получено 25.III.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Вильямс В. Р. Общее земледелие, ч. 1, М., 1919.
2. Вильямс В. Р. Почвоведение с основами общего земледелия. М., 1938.
3. Гельцер Ф., Белякова Е., Чернышева З. Роль органического вещества в структурообразовании почв. Химизация соц. земледелия, 7, 45, 1937.
4. Гельцер Ф. Ю. Значение микроорганизмов в образовании перегноя и прочность структуры почвы. Сельхозгиз, 1940.
5. Гельцер Ф. Ю. Что такое перегной. Почвоведение, № 4, 52, 1940.
6. Канивец. О зонах взаимодействия корневых систем и Сборник памяти В. Р. Вильямса, М., 1942.
7. Кононова М. М. и Александрова И. В. Участие целлюлозных миксобактерий в процессе гумификации растительных остатков. Микробиология, XVIII, 42, 132, 1949.
8. Корсакова М. П. и Никитина Е. А. Разложение пектиновых веществ микроорганизмами. Тр. Инст. с.-х. микробиологии, V, 1933.
9. Костычев П. Образование и свойства перегноя. Тр. СПб. об-ва естествоиспыт. XX, 193—618, 1891.
10. Кравков С. П. Материалы по изучению растительных остатков в почве. СПб., 1908.
11. Кравков С. П. Материалы по изучению русских почв, 21, 1, 1912.
12. Кравков С. П. Материалы по изучению русских почв, 22, 1, 1912а.
13. Кравков С. П. Курс общего земледелия, 1. Агрономическое почвоведение, 1913.
14. Красильников Н. и Никитина Н. Влияние разлагающихся корней на состав микрофлоры в почве. Почвоведение, № 2, 131, 1945.
15. Леваковский И. Ф. Некоторые дополнения к исследованию над черноземом. Тр. Об-ва испыт. природы, Харьков. ун-та 22, 103, 1888.
16. Мишустин Е. Н. и Громыко Е. П. Прочность создаваемых микроорганизмами макроагрегатов почвы. Микробиология, XV (3), 169, 1946.
17. Мишустин Е. Н. Эколого-географическая изменчивость почвенных бактерий. М.— Л., 1947.
18. Орлов Н. Очерки по химии угля, 1934.
19. Ремизов Н. П. Емкость поглощения и состав обменных катионов в главнейших типах почв. Почвоведение, № 5, 383, 1933.
20. Рудаков К. И. Образование гумуса в процессе развития растений. Тр. юб. сессии Докучаева, 236, 1949.
21. Слезкин П. Этюды о гумусе, 1900.
22. Сорокина и Тягны-Рядно М. Г. К вопросу о роли микроорганизмов в образовании гумуса, Микробиология, XI (3), 285, 1933.
23. Стадников. Происхождение углей и нефти, 1933.
24. Трусов А. Г. Материалы к изучению почвенного гумуса, ч. 1. Процессы образования «гуминовой кислоты», 1917.
25. Тюрин И. В. и Кононова М. М. Материалы по изучению органического вещества почвы. Химизация соц. земледелия, 6 и 8, 1934.
26. Тюрин И. В. К характеристике дернового процесса почвообразования. Юбил. сборник, посвящен. 50-летию В. Р. Вильямса, 1935.
27. Тюрин И. В. Органическое вещество почвы, 1937.
28. Шишелова Н. А. Роль протопектиназы в инфекционном процессе у растений. Микробиология, XVII, 252, 1948.
29. Aschan O. Pectin as a source of lignin and humus. Finn. Paper Timber Journ., 366, цит. по Chem. Abstr., 28, 2179, 1932.
30. Czapek F. Biochemie der Pflanzen. 1913.
31. Fischer, F. Was lehrt die Chemie über die Entstehung und die chemische Structur der Kohle. Naturwiss., 9, 958, 1921.
32. Fuchs W. Die Chemie des Lignins, Berlin, 1926.
33. Fuchs W. Über die Beziehung zwischen Huminsäure und Lignin. Brenzst. Chem., 9, 298, 1928.
34. Maillard L. C. Genesis des matières pratiques et des matières humiques. Paris, 1913.
35. Martin T. and Anderson D. Organic matter decomposition, mould flora and soil aggregation relationships. Soil. Sci. Soc. Amer. Proc., 7, 215, 1942.
36. Martin J. Microorganisms and soil aggregation. I. Origin and nature of some of the aggregating substances. Soil Sci, 60, 321, 1945.
37. Martin J. Microognanisms and Soil aggregation. II. Influence of bacterial polysaccharides on soil structure. Soil. Sci., 61 (2), 156, 1946.
38. McHenry J. a. Russel M. Microbial activity and aggregation of mixture of bentonite and sand. Soil. Sci., 57, 351, 1944.
39. Michelet E. L. et Sebelien J. Einige Analysen natürlicher Humuskörper., Chem. Ztg. 30, 356, 1906.
40. Robertson, Raper a. Bauer, Mussinase a bacterial enzyme with hydrolysis synodical fluid mussin and other mussin. J. Biol. chem., 133, 261, 1940.
41. Schrader H. Über die Autooxydation des Lignins der natürlicher Humusstoffe

und d. Kohlen und ihre Beeinflüssig. durch Alkalien. Brenzst. Chemie, 3, 161, 181, 1922.
42. Schreiner O. a. Shorey E. Chemical nature of soil organic matter. U. S. Dept. Agr. Bur. Soils, Bull. 74, 1910.
43. Shorey E. a. Martin J. The presence of uronic acids in soils. J. Chem. Soc., 52, 4907, 1930.
44. Waksman S. a. Starkey R. Influence of organic matter upon the development of fungi, actinomycetes and bacteria in the soil. Soil. Sci., 17, 373, 1924.
45. Waksman S. a. Henkelkian O. Cellulose decomposition by various groups of soil microorganisms. Actes IV, Cong. Intern. Pedol. Rome, 3, 216, 1926.
46. Waksman S. Zellulose als eine Quelle des «Humus» im Erdboden. Zellulosechemie, 8, 97, 1926.
47. Waksman S. a. Reusser H. Über die chemische Natur und den Ursprung des Humus im Erdboden. Zellulosechemie, 11, 209, 1930.
48. Waksman S. a. Iyer. Synthesis of a humus — nucleus, an important constituent of humus in soils, peats and composts. Wash. Acad. Sci., 22, 41, 1932, Soil. Sci., 34, 43, 71; 36, 57, 81, 1932.
49. Waksman S. a. Reusser H. On the origin of the uronic acids in the humus of soil, peat and composts. Soil. Sci., 33, (2), 135, 1932.

РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВЫВЕТРИВАНИИ ГОРНЫХ ПОРОД

II. ОЧАГОВОЕ РАСПРОСТРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПОВЕРХНОСТИ СКАЛЬНЫХ ПОРОД

Н. А. Красильников

При осмотре зарастания скальных пород лишайниками бросается в глаза одна особенность: лишайники разрастаются на поверхности скальных массивов обычно не сплошным слоем, а гнездами, пятнами и очагами. Нередко можно видеть в хаосе каменных нагромождений одной и той же породы (в обрывах горных скал, в каменоломнях и других), как одни глыбы или камни сплошь покрыты лишайниками, а другие, соседние, по внешнему виду ничем не отличающиеся, остаются совершенно чистыми, без единого пятна и без единой колонии этих организмов.

В искусственных сооружениях, построенных из камня одной породы, некоторые камни зарастают лишайниками, другие совсем не зарастают, или же только мелкие их участки и отдельные плиты покрыты лишайниками.

Такую картину избирательного роста лишайников мы наблюдали на колоннах цоколя древнего храма в Эчмеадзине (Армения), а также на остатках разрушенного древнего собора в Звартноце (близ Эчмеадзина). И тут и там камни одной и той же породы имели весьма различную степень зарастания лишайниками: одни камни совершенно чистые, другие, соседние, сплошь заросли.

То же самое можно наблюдать на современных сооружениях — на домах, мостах и других — как в низменных местах, в долинах, ущельях, так и на высоких горных вершинах.

Но наиболее ярко это отмечается на могильных памятниках и плитах. По датам сооружения, указанным на них, можно довольно точно установить не только степень, но и скорость зарастания скальных пород лишайниками. Мы провели подсчет плит, заросших и не заросших лишайниками на кладбищах в разных районах города и в разных поселках (Армения); разбили плиты по датам наложения и по их породам. Полученные данные приведены в табл. 1.

Таблица 1

Время сооружения плит по породам	Базальт				Красный туф				Черный туф			
	всего плит	заросших		незаросших	всего плит	заросших		незаросших	всего плит	заросших		незаросших
		сплошь	слабо			сплошь	слабо			сплошь	слабо	
1884—1900	38	20	12	6	25	10	8	7	22	1	6	15
1901—1915	42	25	9	8	29	8	12	9	26	1	7	18
1916—1925	20	17	8	5	16	2	6	8	16	0	5	11
1926—1935	23	15	10	8	21	1	7	13	31	0	5	26
1935—1940	42	14	13	15	23	0	6	17	27	0	0	27
1941—1946	26	1	8	17	21	0	0	27	18	0	0	18
Итого . .	211	92	60	59	135	21	39	75	140	2	23	115

Исследования показали, что степень и скорость зарастания камней зависят от качества породы. Более мощно обрастают базальтовые породы, чем породы туфа.

Из 211 подсчитанных могильных плит, сооруженных с 1884 г., только 59 сохранились чистыми, не тронутыми лишайниками, что составляет 28%; из 135 плит красного туфа за тот же период не обросли 75, т. е. 55%, а из 140 плит черного туфа сохранились в чистом виде 115, или 82%.

Как видно из приведенных цифр, черный туф менее всех обрастает лишайниками. За 60 лет большинство могильных плит до сих пор остается свободным от этих организмов, а если и зарастает, то единичными, мелкими колониями. Мы не видели ни одной плиты и памятника из черного туфа, сооруженных за последние 10—12 лет, на поверхности которых были бы лишайники, тогда как за тот же период многие базальтовые плиты покрывались ими в большей или меньшей степени. Мы видели отдельные плиты базальта, обросшие в значительной степени лишайниками за 6—7 последних лет. Плиты одной и той же породы имеют разную степень обрастания. Из 143 могильных плит базальта, сооруженных с 1884—1935 гг., сплошь заросли лишайниками 78, слабо заросли 27. То же отмечено и на плитах красного и черного туфа, с той лишь разницей, какая была указана выше. Здесь наблюдается то же самое, что мы видели на скальных породах, на каменных плитах лишайники развиваются пятнами и участками, избирательно.

Столь неравномерное разрастание лишайников на поверхности скалистых пород, их избирательное отношение к отдельным камням и даже глыбам нельзя объяснить случайностью. Избирательность лишайников, отмечаемая всюду в природе, в естественных условиях и на различных искусственных сооружениях, обусловлена спецификой отдельных участков, очагов породы. Эти симбиотические организмы развиваются в тех участках массивов, на тех скалистых глыбах и камнях, которые более благоприятны для их роста и развития. Только различием физико-химических свойств отдельных участков пород, их питательностью, с одной стороны, или наличием веществ, угнетающих рост,— с другой, можно объяснить указанную избирательность лишайников.

Не исключается возможность, что в некоторых случаях, как, например, на породах туфа, слабое развитие лишайников обусловлено какими-либо антибактериальными ядовитыми соединениями тех или других элементов. Указанные различия в химическом составе горных пород, по-видимому, настолько малы, что уловить их не удается ни химическими, ни физическими методами. Биологические реагенты здесь, как и всюду, оказываются более чувствительными.

В предыдущем сообщении (1949) мы установили, что скальные породы имеют с поверхности нарушенный, измененный слой, в котором обитает большое количество микроорганизмов. Эти организмы являются первыми поселенцами первородных горных пород, они подготавливают почву для других существ.

Чтобы уточнить значение микроорганизмов в разрушении горных пород, а равно подойти к выяснению причин очаговости распространения лишайников и свободноживущих микроорганизмов, мы провели специальные исследования.

Для выяснение степени использования элементов скальных пород в качестве источников минерального питания микроорганизмам, обитающими в поверхностном, измененном слое породы были отобраны образцы базальта и красного туфа, собранные в каменоломне близ Ботанического сада Академии Наук Армянской ССР. Из центральной не тронутой микробами части образцов-монолитов вынимались после раздробления кусочки, которые размельчались в мелкий порошок.

Навеска такого порошка в 5 г вносилась в 1000 мл дестиллирован-

ной воды, куда прибавлялись 0,2 г K_2HPO_4, 0,5 NH_4NO_3 и 20 г сахарозы. В среду не прибавлялись другие источники минерального питания с тем, чтобы таковые были взяты микроорганизмами из внесенной породы базальта или туфа. По данным Лебедева (1931), в состав этих пород входят следующие элементы

Элементы	В андизито-базальте (%)	В туфовой породе (%)
SiO_2	56,05	61,70
TiO_2	0,93	0,86
Al_2O_3	16,91	16,26
Fe_2O_3	2,80	3,60
FeO	4.31	0,70
MnO	0,07	0,09
MgO	5,21	1,44
CaO	7,77	3,79
Na_2O	2,34	3,32
K_2O	2,51	3,97

Приготовленные указанным способом среды разливались по колбам Эрленмейера по 100 мл в каждую и стерилизовались при 110° 30 минут в автоклаве. После охлаждения среды заражались микроорганизмами и помещались в темное место при температуре 20°. Заражение производилось соскобом из разрушенного поверхностного слоя тех же пород: для заражения сред с базальтовым порошком брался соскоб с базальтов, а для сред с порошком туфа — соскоб с туфа. Велись наблюдения за развитием микроорганизмов в этих средах.

Через определенные промежутки времени производился количественный учет развивающихся бактерий. Были поставлены две серии опытов по три повторности каждого варианта.

Общая картина развития микроорганизмов такова: в первые 5—10 дней заметного развития в колбах не отмечается, среды остаются прозрачными. Нет ни пленки, ни постепенного кольца. Затем появляется муть, которая усиливается постепенно, доходит до своего максимума. К этому времени на поверхности среды начинают развиваться грибки, образуя сначала тонкую пленку. Последняя становится все толще и толще, имеет сероватый или бурый цвет. Поверхность: пленки покрыта воздушным мицелием. В период формирования и развития пленки среда нередко окрашивается в светлый буровато-желтый или темнобурый цвет. Окрашивается и осадок — порошок породы. Завершение роста микроорганизмов в колбах сопровождается просветлением среды.

Весь описанный процесс длится разные сроки от одного до трех месяцев, в зависимости от условий роста питательной среды и посевного материала.

Количественый учет развития микроорганизмов в колбах производится методом прямого подсчета. Для этого одна капля (0,05 мл) среды с культурой наносилась на предметное стекло, размазывалась равномерно по поверхности в 1 $см^2$ площади, подсушивалась и окрашивалась метиленовой синью. После этого подсчитывалось в поле зрения число клеток и полученное число перемножалось на число полей, вмещающихся на площади препарата. Когда культуральная среда была слишком густая, насыщенная микроорганизмами, ее предварительно разводили в воде и из соответствующего разведения делали препарат на предметном стекле. В данных случаях учитывались микробные клетки, находившиеся только во взвешенном состоянии. Те клетки, которые развивались в осадке и в кольце по стенкам сосуда или в пленке, учету не подлежали, так как для этого потребовалось бы тщательное перемешивание или взбалтывание содержимого колбы, в том числе и внесенного порошка скальной породы, частицы которой попадали бы на препарат и мешали бы подсчету бактериальных клеток.

Результаты этих подсчетов сведены в табл. 2 как средние повторных опытов и анализов.

Таблица 2

Развитие микроорганизмов на синтетической среде скальной породы как источнике минерального питания

(число клеток в 1 мл среды в тыс.)

Породы	Возраст культуры в днях							
	0	5	10	20	30	40	60	80
Базальт	0,01	20,0	420,0	8500	120	64	30	30
Туф	0,01	1,0	10,0	80	260	120	32	10

Как видно из таблицы, в среде с базальтовой породой развитие микроорганизмов протекает быстрее и значительно обильнее, чем в среде с порошком туфа. Иными словами, базальтовая порода более благоприятна для роста этих существ.

Кроме общего подсчета проводилась также качественная групповая характеристика. Для этого культуральная жидкость в описанных выше опытах высевалась на агаризованные питательные среды — мясопептонный агар (МПА), сусло-агар (СА), синтетическую среду Чапека и безазотистую среду Эшби. (Сусло-агар применялся для учета грибов).

Среда Чапека в составе своем имеет различные минеральные соли, нитратный азот как источник азотистого питания и сахарозу как источник углеродистого питания. Среда Эшби тоже состоит из различных минеральных солей, но без азота, а в качестве источника углеродистого питания применяется сахароза, глюкоза или маннит.

На эти среды в чашки Петри высевалась одна капля культуры, размазывалась стеклянным шпателем и через 5—10 суток инкубации производился подсчет выросших колоний. В тех колбах, где было слишком большое развитие микроорганизмов, культура перед посевом разводилась водой до определенной концентрации. Из каждой колбы посев производился в двух-трех чашках из убывающих разведений культуры. Результаты этих исследований сведены в табл. 3 как средние цифры всех повторных опытов и анализов.

Исследования показывают, что основную массу микроорганизмов, развивающихся в наших опытных колбах, составляют бактерии и микобактерии (примерно 95—98%). Значительно меньше актиномицетов. Грибы начинают развиваться в конце опыта, когда заканчивается рост бактерий и микобактерий. Они образуют мощную пленку, выделяют в среду красящее вещество. Видовой состав грибов различен, в большинстве они относятся к несовершенным формам (Fungi imperfecti).

Из бактерий обнаруживаются Pseudomonas и Bacterium, преимущественно бесцветные формы.

Количественное соотношение бактерий и микобактерий в разных случаях различно. Мы не уловили закономерной зависимости количественного соотношения микроорганизмов от состава скальной породы, но в некоторых образцах базальта мы наблюдали преимущественное развитие микобактерий, иногда пигментированных: желтые — M. flavum и желто-зеленые или лимонно-желтые — M. citreum.

Приведенные в табл. 3 цифры показывают, что наибольшее количество микроорганизмов относится к группе развивающихся на среде Эшби, несколько меньшее число обнаруживается на среде Чапека.

Наименьшую группу составляют организмы, развивающиеся на белковой среде (МПА).

Следует отметить, что на агаре Эшби колонии выросших организмов, как правило, имеют очень мелкие размеры, обычно не превышающие

Таблица 3

Качественная характеристика микроорганизмов, выросших в синтетической среде с горной породой

(число клеток в 1 мл среды в тыс.)

Возраст культуры в днях	Базальт			Туф		
	МПА	Чапек	Эшби	МПА	Чапек	Эшби
Исходная	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
5	40	200	640	0,6	1,2	1,8
20	200	6500	12 000	28	180	300
60	64	300	1 000	30	65	100

1 мм в диаметре; колонии часто едва видимы простым глазом; многие же заметны только в сильную лупу. Колонии плоские, прозрачные или полупрозрачные, с ослизненной поверхностью.

При пересевах на свежие питательные среды лишь немногие колонии приживаются. Основное большинство их не удается отсеять в пробирки и культивировать на какой-либо из многочисленных испытанных сред — простых синтетических (Чапека, Боннера, Эшби) и сложных, органических (мясопептонные, желатиновые, бобовый отвар, сусло и др.).

Микробиологический анализ показал, что организмы, развивающиеся на агаре Эшби такими мелкими колониями, принадлежат в основном большинстве к трем группам: Bacterium, Pseudomonas и Mycobacterium.

По характеру роста эти организмы похожи на организмы, развивающиеся в поверхностном слое скальных пород базальта, гранита, и других (Красильников, 1949).

На безазотистом агаре Эшби нередко вырастают мощные, слизистые, прозрачные или полупрозрачные колонии. Число их обычно ограниченно — 5—10 в чашке Петри или от 100 до 1000 клеток в 1 мл среды. Организмы, образующие такие мощные колонии, относятся чаще к спороносным бактериям, реже к микобактериям и неспороносным бактериям. В отдельных случаях они напоминают по внешнему виду колонии азотобактера. Эти организмы составляют особую группу олигонитрофилов. Они мало изучены и безусловно представляют значительный интерес.

Бактерии и микобактерии, развивающиеся на Эшби-агаре, вместе с олигонитрофилами, повидимому, являются наиболее специализированными формами. Они приспособлены к особым условиям существования на голодных, не доступных для других организмов субстратах, где нет ни сложных органических веществ, ни минерального азота в должном количестве. Это — первые поселенцы скальных пород. Они одни или вместе со свободноживущими водорослями подготовляют почву для последующих организмов растительного и животного мира.

Группа микроорганизмов, развивающихся на синтетической среде Чапека, также довольно многочисленна (табл. 3). По видовому составу они относятся в основном к Bacterium, Pseudomonas и Mycobacterium. Преобладающее место имеют то первые, то вторые, в зависимости от образца скальной породы, местонахождения и других причин.

Эта группа организмов, повидимому, также имеет большое значение в освоении первичных горных пород. Сравнительно малая потребность в источниках органического питания дает им возможность развиваться на голодных и полуголодных средах и иметь преимущество перед другими микроорганизмами.

Третья группа организмов, развивающаяся на белковых средах, немногочисленна. Состоит она в основном из бактерий преимущественно неспороносных — Pseudomonas, Bacterium; значительно меньше обнаруживаются среди этой группы микобактерии.

Спороносные бактерии вообще слабо развиваются в средах с гор-

ными породами. В высевах на белковых средах (МПА) они составляют не более 5%, а чаще 0,5—1% от всей бактериальной флоры.

Третья группа микроорганизмов, как видно из табл. 3, не является доминирующей в горно-скальной микрофлоре. Организмы этой группы развиваются, повидимому, как спутники первых двух групп, пользуясь продуктами их метаболизма. Количественное их развитие обусловлено наличием последних, и естественно, оно не может быть обильным.

Сопоставляя видовой состав микрофлоры, выросшей в среде с базальтовой породой, с микрофлорой, развивающейся на среде с порошком туфа, мы не могли заметить существенного различия. В том и другом случае обнаруживаются три группы микроорганизмов. Мы не могли провести более тщательный дифференциальный анализ этой микрофлоры. Возможно, что мы не смогли уловить более детальную специфику состава в наших анализах. В предыдущей статье мы отмечали, что горные породы зарастают участками, и высказали предположение о неоднородности их состава. Это предположение побудило нас провести специальные исследования на питательность отдельных скальных монолитов, хорошо обрастающих лишайниками и лишенных их.

Для опытов были взяты образцы базальта, собранные в Армении на Пушкинском перевале в 1947 г. (высота около 2000 м над уровнем моря). Скалистая вершина у перевала характерна тем, что часть каменных глыб ее сплошь покрыта мощным слоем различных лишайников, а часть совершенно голая, хотя по составу та и другая однородны. Монолиты указанных глыб, взятые из середины последних, дробились и растирались в мелкий порошок, который прибавляется к среде как источник питания (состав среды тот же, что и для предыдущих опытов).

После стерилизации среды заражались микрофлорой поверхностного измененного слоя базальта (соскоб с поверхности).

Результаты трех повторных опытов приведены в табл. 4. Из них видно, что участки скальной породы, обросшие лишайниками, благоприятнее и для развития микроорганизмов, чем участки, не обрастающие ими.

Выводы

1. Обрастание скальных пород лишайниками и другими микроорганизмами происходит очагами.

2. Изучены породы базальта и туфа как источник минерального питания для микроорганизмов.

3. Установлено, что на базальтовых породах микроорганизмы развиваются лучше, чем на среде с туфом.

4. Наибольшее развитие на средах со скальными породами имеют бактерии и микобактерии, значительно слабее актиномицеты и грибы.

По характеру роста все эти микроорганизмы подразделяются на три группы:

а) организмы, обнаруживаемые посевом на безазотистой среде Эшби; они составляют вместе с олигонитрофилами наиболее обширную группу;

б) организмы, обнаруживаемые путем высева на синтетические среды с минеральным азотом; также составляют многочисленную группу скальных микроорганизмов и

в) наименее многочисленна группа бактерий и микобактерий, выявляемая высевом на белковые среды (МПА).

5. Одна и та же скальная порода неоднородна по химическому составу. Существуют обрастаемые и необрастаемые лишайниками участки. Такие участки монолитов базальта, растертые в порошок и прибавленные к основной среде, оказывают различное влияние на развитие скальных микроорганизмов.

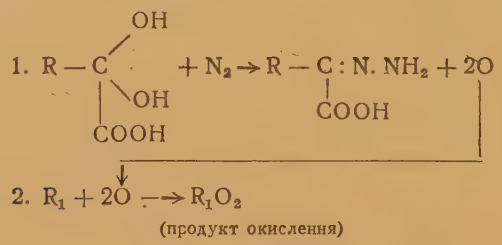
Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 8. I. 1949

ТЕОРИЯ ПРОЦЕССА ФИКСАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА БАКТЕРИЯМИ ПРИ УЧАСТИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО КАТАЛИЗАТОРА

М. В. Федоров

В опубликованных нами работах [5 и 6] приводились экспериментальные данные о наличии в составе клеток азотобактера особого катализатора, участвующего в процессе фиксации атмосферного азота и содержащего в своем составе карбоксильную, аминную и карбонильную группы. На основе этих данных была развита предварительная схема фиксации в следующем виде [6]:



Однако в этой схеме имелись слабые места: во-первых, не было точных сведений, какие окислительно-восстановительные условия обеспечивают наиболее успешное течение этого процесса, и, во-вторых, не было достаточных данных как о химической природе катализатора, так и о биохимическом механизме его участия в процессе. Только в ходе дальнейших исследований удалось получить данные, на основе которых появилась возможность дать развернутую схему биохимического хода этого важнейшего процесса.

Эти данные основываются на следующих положениях: 1) угнетающее влияние поверхностно-активных веществ на фиксацию атмосферного азота азотобактером позволяет признать, что катализатор, вырабатываемый этим организмом, вероятно, имеет двухкомпонентное строение [3], так как блокировка пограничной поверхности между активной группой и коллоидным носителем прекращает процесс; 2) коллоидный носитель имеет, видимо, белковую природу, так как блокировка его галловой и фосфорно-вольфрамовой кислотой сокращает продуктивность фиксации на 80% и более. В результате этих исследований вопрос о химической природе катализатора стал более ясным. Но вслед за этим возник другой важный вопрос: за счет каких же связей происходит взаимодействие между молекулярным азотом и катализатором и при каких условиях окислительно-восстановительного потенциала оно осуществляется? Вначале казалось, что в этом разделе исследования встретятся непреодолимые трудности, однако решение вопроса пришло довольно быстро. При постановке опытов с вымораживанием культур азотобактера (вместе с питательной средой при —10° или —15°) было установлено, что активность катализатора вновь восстанавливается в присутствии аскорбиновой кислоты. Это наблюдение дало основу для предположения, что реакция фиксации связана с вибрацией двойных связей между углеродом и кислородом. Опыты ставились на питательной среде с инвертным сахаром. В колбу 300 мл объемом добавлялось 100 мл среды с 1,8 г инвертного

сахара. После 7—10-дневного выращивания Azotobacter agile на этой среде (сахар из среды почти полностью потреблялся) культура вымораживалась при указанной температуре и вновь оттаивалась при +30°. Далее в среду добавлялся инвертный сахар (1,8 г) с соблюдением условий полной стерильности и колбы ставились в термостат на 25—30 дней (температура +30°). По истечении этого срока производились определения неиспользованного сахара (по Бертрану) и общего азота (по Кьельдалю).

Результаты одного из этих опытов приводятся в табл. 1.

Таблица 1

Влияние аскорбиновой кислоты на фиксацию азота атмосферы вымораживавшимися клетками Az. agile

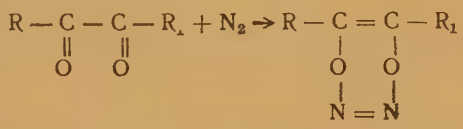
Концентрация аскорбиновой к-ты в среде в мг	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г-моль гексоз	
I. Однократное вымораживание						
1 0,00	0,90	100,0	10,79	11,48	2 066,4	100,0
	0,65		12,17			
2 100,0	0,90	109,7	18,02	18,05	3 249,0	157,2
	0,80		18,07			
II. Двукратное вымораживание						
1 0,00	0,25	100,0	6,28	7,94	1 429,2	100,0
	0,70		9,60			
2 100,0	1,30	289,4	12,02	12,63	2 273,4	159,0
	1,45		13,24			
III. Трехкратное вымораживание						
1 0,00	0,50	100,0	8,41	9,45	1,701,0	100,0
	0,50		10,50			
2 100,0	1,80	340,0	12,40	12,47	2,244,6	132,0
	1,60		12,54			

Как видно из этих данных, в присутствии аскорбиновой кислоты нарушенные вымораживанием физиологические функции организма почти полностью восстанавливаются. В первую очередь восстанавливается дыхание, а параллельно с ним и фиксация азота атмосферы. Повидимому, аскорбиновая кислота восстанавливает какое-то выпавшее звено в строении фермента и вновь делает его активным. Если мы учтем, что фермент имеет двухкомпонентное строение и в процессе фиксации принимает участие карбонильная группа, то положительное влияние аскорбиновой кислоты можно объяснить только тем, что она частично заменяет инактивированную при вымораживании активную группу. А если это так, то следует далее предполагать, что в процессе фиксации атмосферного азота участвуют две карбонильные группы, возникающие за счет дегидрирования гидроксильных групп, расположенных у смежных атомов в углероде [2]:

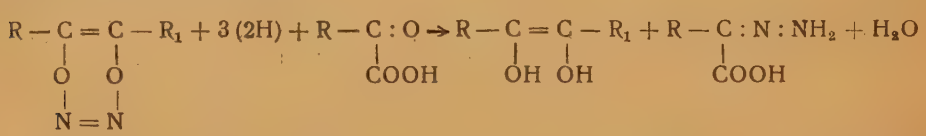
$$R-\underset{|}{\overset{OH}{C}}=\underset{|}{\overset{OH}{C}}-R_1 \xrightarrow{[2H]} R-\underset{\|}{\overset{O}{C}}-\underset{\|}{\overset{O}{C}}-R_1$$

(2H связываются акцептором)

Сначала двойная связь между смежными атомами углерода активной группы превращается в одинарную в результате дегидрирования гидроксильных групп, а затем, при обратном возникновении двойной связи между этими атомами углерода, у кислородных атомов появляются свободные связи. За счет окислительного воздействия этих свободных связей и происходит, повидимому, присоединение молекулы азота к кислородным атомам. Необходимый окислительный потенциал для такой функции атомов кислорода создает коллоидный носитель. В эту фазу процесса он должен быть представлен белком с окислительным потенциалом не ниже +300 mV. Схематично эта реакция может быть представлена следующим образом:



После взаимодействия молекулы азота с карбонильным кислородом начинается процесс дальнейшего восстановления первичных продуктов фиксации активным водородом, мобилизуемым из органического вещества различными дегидразами. В результате этого восстановления и образуются производные гидразина и кетокислот, восстанавливающиеся далее в аминокислоты



При таком ходе процесса фиксации возникали бы затруднения только на первом этапе, когда образуются кислородные связи между азотом и углеродом. Такого рода связи довольно редко встречаются среди органических соединений, но в отдельных случаях они все же имеют место (например, в группе изо-нитросоединений). Возникновение этих связей легко объясняло бы и наблюдаемый эффект от аскорбиновой кислоты при добавлении ее в вымораживавшуюся культуру азотобактера. Кроме того, понятной стала бы и смена окислительно-восстановительного потенциала в ходе самого процесса фиксации. В первой фазе он должен был бы быть выше, чем во второй, а стало быть и коллоидный носитель, от которого зависит высота окислительного потенциала, будет меняться в процессе реакции. Так как потенциал первой фазы реакции лежит между +80 и +200 mV, а во второй фазе смещается до —200 mV, то донаторы водорода, обслуживающие вторую фазу процесса, не могут оказать существенного влияния на первую (кислородную) фазу. Между ними слишком велика разница в потенциале, а в биологических системах, как известно, реагируют только соединения с близкими окислительно-восстановительными потенциалами. При таком ходе реакции стало бы понятным и значение кислорода для фиксации молекулярного азота азотобактером. Акцептируя водород от активной группы фермента азотфиксации, он будет способствовать образованию карбонильных групп и тем самым усиливать процесс фиксации. На активные же формы водорода, мобилизованные дегидразами, он не будет оказывать влияния из-за слишком большой разницы в окислительном потенциале. Кроме этого стал бы понятным и другой давно известный факт, что наиболее активным фиксатором азота атмосферы является аэробный азотобактер, а не анаэробные фиксаторы, располагающие избыточным количеством водорода, выбрасываемым из среды в молекулярной форме. В последнем случае малая активность обусловливалась бы тем, что первая фаза процесса тормозилась бы трудностью образования сво-

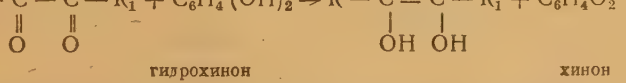
бодных карбонильных групп вследствие слишком низкого окислительного потенциала. Наряду с этим стали бы понятными и данные по влиянию на азотфиксацию восстановителей и окислителей (например, гидрохинона, хингидрона и хинона). Гидрохинон, понижая окислительный потенциал, должен бы мешать образованию свободных карбонильных групп и понижать фиксацию, а хинон, наоборот, повышать ее (табл. 2). Опыты показывают, что указанные вещества именно так и влияют на фиксацию [3].

Таблица 2

Влияние на фиксацию азота атмосферы Az. agile гидрохинона и хингидрона

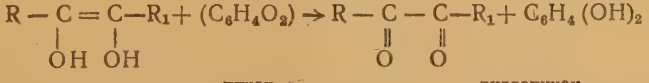
Концентрация в среде в молях	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в % от контроля
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г-моль-гексоз	
0,00	1,70	100,0	16,52	15,98	2 876,4	100,0
	1,75		15,44			
I. Гидрохинон						
0,001	1,70	100,0	16,80	16,37	2 946,6	102,5
	1,75		15,93			
0,005	1,55	85,1	15,25	14,17	2,550,6	88,6
	1,30		13,10			
II. Хингидрон						
0,001	1,80	101,4	16,33	16,21	2 917,8	101,3
	1,70		16,08			
0,005	1,05	75,4	16,17	15,95	2 871,0	100,0
	1,55		15,73			

Гидрохинон действительно понижает фиксацию атмосферного азота, а хингидрон и хинон повышают ее. Угнетающее влияние гидрохинона связано с восстановлением карбонильных групп катализатора осуществляющимся по следующему уравнению:



гидрохинон хинон

А активирующее действие хинона и даже хингидрона связано с образованием карбонильных групп согласно со следующим уравнением:



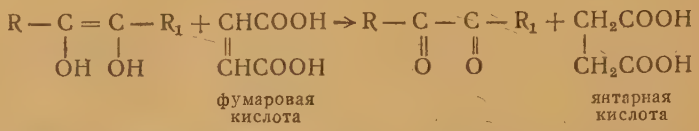
хинон гидрохинон

Благодаря более легкому возникновению карбонильных групп процесс фиксации атмосферного азота в присутствии хингидрона идет более продуктивно, чем в присутствии гидрохинона. Еще продуктивнее он идет в присутствии хинона, способного еще в большей мере отвлекать водород и способствовать образованию свободных карбонильных групп.

Близкие результаты получаются и при добавлении в среду цистина. Это соединение также может присоединять атомы водорода и тем самым способствовать образованию свободных карбонильных групп:

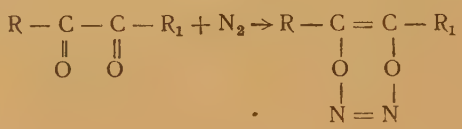
Поэтому при добавлении в среду цистина в концентрации в 0,001 моля продуктивность азотфиксации возрастает на 27%. В отличие от него сероводород, восстанавливая карбонильные группы, понижает продуктивность азотфиксации примерно на 40%.

Фумаровая и аконитовая кислоты, присоединяя по месту двойных связей водород, также будут благоприятствовать образованию карбонильных групп и должны усиливать азотфиксацию:



И это действительно оправдывается в опыте. При наличии некоторого количества этих соединений в среде (0,005 моля) фиксация азота повышается на 12—15%. Аналогичный результат получается и с перекисью водорода. При 0,015 моля этого соединения в среде продуктивность фиксации возрастает на 28,2%.

Все эти данные с полной определенностью указывают на возможное участие в процессе фиксации двух рядом расположенных карбонильных групп по уравнению:



Подсчет энергии связей показывает, что такая реакция вполне возможна. Вот примерные расчеты: двойная связь между углеродом и кислородом оценивается в 155 ккал на моль, а одинарная связь — в 75 ккал; двойная связь между атомами углерода равноценна 101,16 ккал, а одинарная — 62,7 ккал. Сумма связей двух углеродов со свободными карбонильными группами равна 372,7 ккал [62,7 + + (155 · 2) = 373,7], а сумма связей тех же углеродов без карбонильных групп, но с присоединенным к кислороду азотом, равна 373 ккал [101,16 + (75 · 2) + (61 · 2) = 373,1] на моль, т. е. практически той же самой величине (энергия связей приводится по Сыркину и Дяткиной [1]). Это совпадение величин и указывает на полную возможность вышеуказанной реакции. Если принять ее за основу процесса, а весь экспериментальный материал говорит именно за эту реакцию, то придется признать, что первичными продуктами фиксации атмосферного азота являются его кислородные производные с углеродом, а не соединения с водородом, как это полагали все исследователи, изучавшие этот процесс до настоящего времени. Принятие этой реакции за основу процесса позволило бы полностью объяснить и все факты, добытые нами при изучении фиксации атмосферного азота бактериями. Во-первых, стало бы понятным, почему в составе активной или простетической группы катализатора азотфиксации обязательно имеются установленные нами карбонильная, карбоксильная и аминная группы. Во-вторых, можно было бы с достаточной обоснованностью определить место и значение для каждой из этих группировок в структуре простетической группы катализатора.

Карбоксильная группа, повидимому, расположена рядом с одной из карбонильных групп. Ее назначение — повышать окислительные свойства карбонильных кислородов. Аминная группа расположена рядом или вблизи с другой карбонильной группой. Ее назначение — способствовать временной стабилизации первичных продуктов фиксации азота атмосферы аналогично с тем, как аминная группа повышает устойчивость амидной группы в аспарагине.

Далее стало бы понятным, почему блокировка аминной группы альдегидами прекращает процесс фиксации. В этом случае не только меняется физико-химическое состояние простетической группы за счет введения в ее состав восстановленных атомов углерода, но, вероятно, и прямое связывание карбонильного кислорода посредством промежуточных связей. Блокировка же аминной группы борной, молибденовой и фосфорномолибденовой кислотами должна в возрастающей степени повышать продуктивность фиксации, так как введение в молекулу активной группы катализатора сильно окисленных соединений делает карбонильные группы менее устойчивыми и повышает их окислительный потенциал. И это действительно наблюдается в опытах. Вводя в состав активной группы борную или молибденовую кислоту, мы как бы доделываем работу по наиболее рациональному конструированию этой группы, которую еще не закончила природа в процессе эволюции данного бактериального организма. И это весьма знаменательно. Мы начинаем не только понимать ход процесса в живом организме, но находим и пути для его переделки и совершенствования. Кроме того, такое толкование механизма влияния борной и молибденовой кислот разрешило бы, наконец, и многолетний спор о значении молибдена и бора для фиксации. Они оказываются неспецифическими участниками процесса. Бор и молибден не входят в состав ферментов, обслуживающих азотфиксацию, но они улучшают состояние простетической группы катализатора и тем самым способствуют фиксации молекулярного азота. Основываясь на этих материалах, мы должны активной группе катализатора азотфиксации приписать следующее структурное строение

$$R-CHNH_2-?-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH$$

Какова природа радикала R и имеются ли между аминной группой и карбонильным углеродом еще какие-нибудь группы — пока трудно определить с полной надежностью, но так как через радикал происходит присоединение активной группы к коллоидному носителю — белку, то не исключена возможность, что он представляет собой вторую карбоксильную группу. В этом случае активная группа катализатора могла бы быть признана за дикетоаминоглутаровую кислоту или близкое к ней соединение (например, соответствующее производное адипиновой кислоты)

$$COOH\,.\,CHNH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH$$

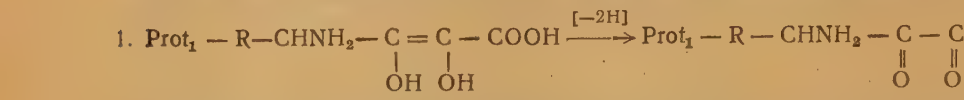
Но так как последнее положение пока еще не доказано экспериментально, то будем считать подобную возможность только вероятной, но не обязательной. Кроме активной группы, в состав катализатора азотфиксации входит еще и белок в качестве коллоидного носителя. Поэтому полная структура этого фермента должна приближаться к следующей формуле:

$$Prot-R-CHNH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH$$

В разных стадиях процесса коллоидный носитель должен меняться, так как окислительные условия процесса слишком различны. В первой фазе процесса в качестве коллоидного носителя, вероятно, участвует белок с высоким окислительным потенциалом (не ниже +200, +300 mV), а во второй фазе — белок с низким окислительным потенциалом (вероятно, около —200, —300 mV).

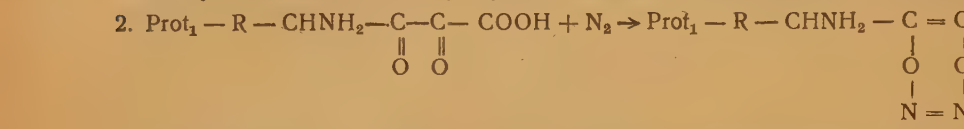
Учитывая все эти положения, нашу схему фиксации в развернутом виде можно выразить следующим циклом реакций.

Сначала идет дегидрирование активной группы катализатора, сопровождающееся образованием свободных карбонильных групп:



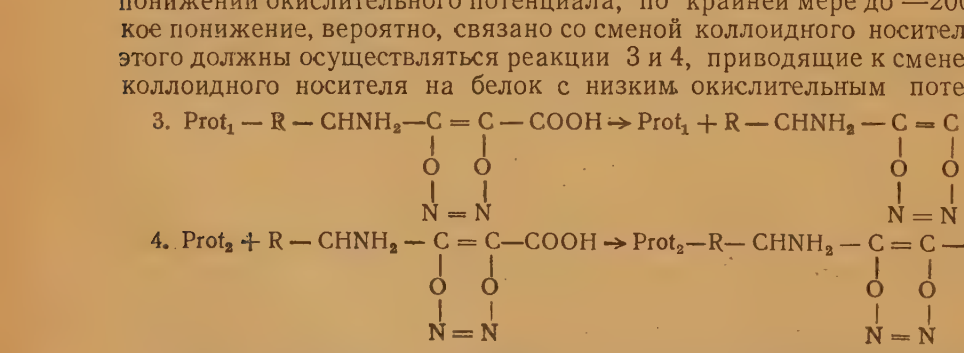
Эту фазу выполняет активированный кислород или же другой акцептор водорода с высоким окислительным потенциалом (цитохром С, гемоглобин, дегидроаскорбиновая кислота, цистин, фумаровая кислота, хинон и другие). В присутствии этих соединений азотфиксация должна итти весьма успешно. Восстанавливающие же вещества (молекулярный водород, гидрохинон, сероводород и другие), наоборот, будут мешать фиксации, так как они восстанавливают карбонильные группы. Такое влияние этих соединений было доказано экспериментально и подтверждает именно такой ход процесса в первой фазе.

Образовавшиеся в этой фазе реакции карбонильные группы взаимодействуют далее с молекулярным азотом и окисляют его по уравнению:

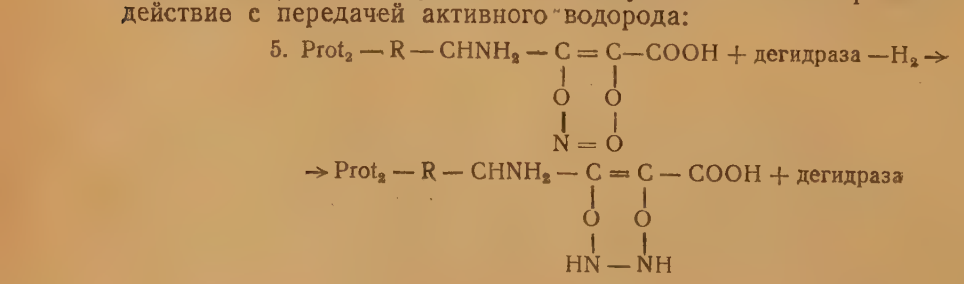


Наличие карбоксильной группы рядом с карбонильной и введение в состав катализатора борной или молибденовой кислот через аминную группу должно благоприятствовать фиксации, так как при этом окислительная активность карбонильного кислорода возрастает. Опыты показывают, что это действительно так и происходит. Борная и молибденовая кислоты в возрастающей степени повышают продуктивность фиксации, а тяжелые металлы, связывающие карбоксильную группу, понижают фиксацию.

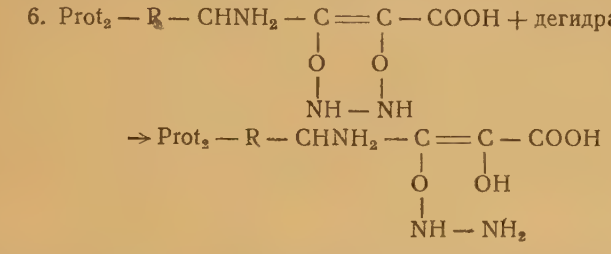
После того как заканчивается первая фаза процесса, должно следовать дальнейшее восстановление первичных продуктов фиксации азота активным водородом. Однако эта важная стадия возможна только при понижении окислительного потенциала, по крайней мере до —200 mV. Такое понижение, вероятно, связано со сменой коллоидного носителя. В силу этого должны осуществляться реакции 3 и 4, приводящие к смене первого коллоидного носителя на белок с низким окислительным потенциалом.



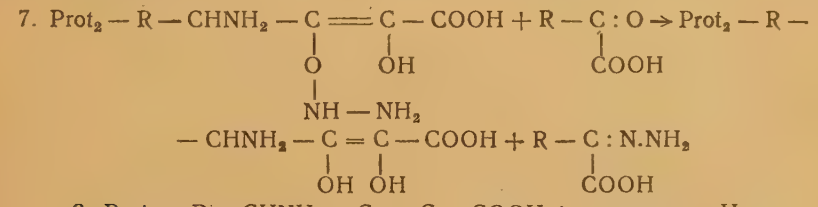
После этой смены коллоидного носителя общий окислительный потенциал катализатора становится близким к потенциалу восстановленного дыхательного фермента и между ними может произойти взаимодействие с передачей активного водорода:

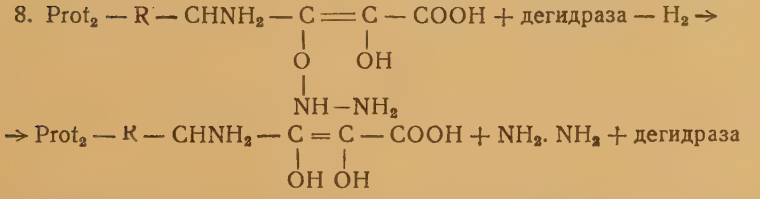


При следующем взаимодействии дегидразы с первичным продуктом фиксации вероятнее всего, что одна связь кислорода с азотом разрывается и образуется производное гидразина со смешанными функциями, в котором восстановленный атом азота сочетается с окисленным атомом азота, делая продукт более устойчивым:

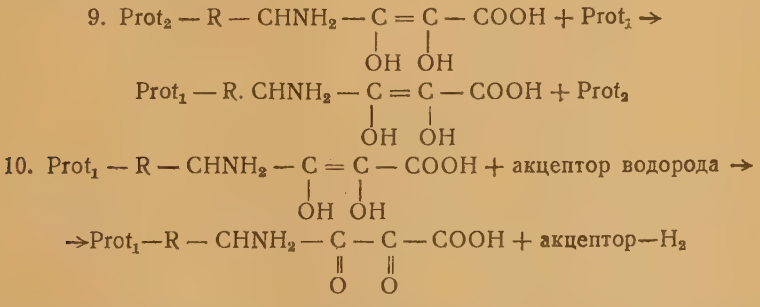


Это соединение или восстанавливается до гидразина с освобождением активной группы катализатора или же продукты фиксации передаются кетокислотам для образования с ними соответствующих производных гидразина. Оба варианта этой реакции можно выразить следующими уравнениями:





После передачи гидразина кетокислоте катализатор должен вновь подвергнуться окислению. Для этого он меняет коллоидного носителя ($Prot_2$) с низким окислительным потенциалом на первоначального коллоидного носителя ($Prot_1$) с высоким окислительным потенциалом, а затем уже подвергается и дегидрированию кислородом или другим подходящим акцептором водорода:



После этого катализатор вновь может участвовать в процессе фиксации молекулярного азота, окисляя его атомы, как указано выше. Гидразин же (или его производные), реагируя с активным водородом, может дать две молекулы аммиака, реагируя с водой, дает аммиак и гидроксиламин, а реагируя с кетокислотой и водородом, переходит в состав аминокислот:

11. $NH_2 — NH_2 + \text{дегидраза}\ H_2 \rightarrow 2NH_3 + \text{дегидраза}$

12. $NH_2 \cdot NH_2 + H_2O \rightarrow NH_3 + NH_2OH$

13. $R — \underset{\underset{COOH}{|}}{C} : N \cdot NH_2 + 3(2H) + R — \underset{\underset{COOH}{|}}{C} : O \rightarrow 2R \cdot \underset{\underset{COOH}{|}}{CH} \cdot NH_2 + H_2O$

В силу этого аммиак и гидроксиламин могут образоваться в культурах азотобактера, но оба эти вещества будут аномальными продуктами фиксации и образуются только при недостатке кетокислот, служащих акцепторами гидразина. Прямого отношения к продуктам фиксации они иметь не будут, и все схемы, основанные на образовании этих продуктов в качестве первичных продуктов фиксации, теряют свое основание. В конечном же итоге весь фиксированный азот оказывается в составе аминокислот и белковых веществ азотобактера.

При разобранном ходе процесса абсолютно все факты, связанные с ходом фиксации атмосферного азота бактериями, получают свое объяснение. Положительное действие кислорода, перекиси водорода и других окислителей связано с образованием свободных карбонильных групп у катализатора азотфиксации, а угнетающее действие молекулярного водорода, гидрохинона, сероводорода и других восстановителей связано с восстановлением карбонильных групп. Угнетающее действие окиси углерода, гидроксиламина и фенилгидразина связано с блокировкой карбонильной группы, а угнетающее действие альдегидов, реагирующих с аминной группой, связано с введением в молекулу активной группы восстановленных соединений, мешающих окислению азота и так же блокирующих карбонильную группу. Активирующее действие борной и молибденовой кислот основано на введении в молекулу активной группы катализатора окисленных соединений, благоприятствующих окислению азота за счет более легкой вибрации двойной связи между атомами углерода и кислорода.

$$R — CHNH_2 — \underset{\underset{O}{\|}}{C} — \underset{\underset{O}{\|}}{C} — COOH + H_2MoO_4 \rightarrow R — CHNH(HMoO_3) — \underset{\underset{O}{\|}}{C} — \underset{\underset{O}{\|}}{C} — COOH + H_2O$$

Угнетающее же действие поверхностно-активных веществ можно объяснить блокировкой пограничных поверхностей между активной группой и коллоидным носителем, а угнетающее действие тяжелых металлов — изменением состояния как активной группы, так и коллоидного носителя. Даже благоприятное действие щавелево-уксусной кислоты легко объясняется и будет связано с акцептированием производных гидразина от активной группы катализатора и освобождением последней для дальнейшего участия в процессе фиксации. Проще говоря, решительно все факты, известные науке до сих пор, становятся понятными и занимают свои места. При таком ходе процесса получается возможность не только объяснить природное явление, но и вмешаться в его течение и управлять им. Во-первых, мы получаем возможность повысить эффективность работы каталитического аппарата, вводя по месту аминной группы окисленные соединения типа борной и молибденовой кислот. В их присутствии вибрация двойной связи у карбонильных групп облегчается и продуктивность фиксации почти в два раза увеличивается. Во-вторых, вводя в субстрат карбонильные соединения, мы можем часть фиксированного азота отвлечь из клеток азотобактера в питательный раствор, что с очевидностью было показано нами в предыдущих работах [5].

Столь значительное отвлечение продуктов фиксации в раствор при наличии в нем карбонильных соединений следует считать прямым доказательством хода процесса через стадию гидразинов. Это же положение подтверждается и доступностью для азотобактера азота гидразинов, хотя им и усваиваются только некоторые формы связанных соединений

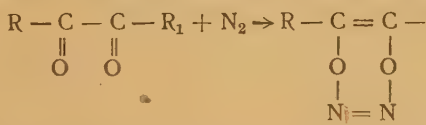
азота (аммиак, гидразины, семикарбазиды, нитраты, нитриты и некоторые аминокислоты в крайне ограниченных количествах). Такова фактическая сторона дела, и она полностью подтверждает развитую нами новую теорию химизма фиксации молекулярного азота бактериями. Там, где в течение почти пятидесяти лет высказывались только остроумные догадки, теперь имеются экспериментально установленные факты, позволяющие довольно детально восстановить картину физиологического хода этого важнейшего процесса, имевшего столь существенное значение для развития жизни на земной поверхности. Все, что наука накопила в отношении этого процесса до сих пор, получает, наконец, логическое и, как нам кажется, вполне обоснованное объяснение.

Выводы

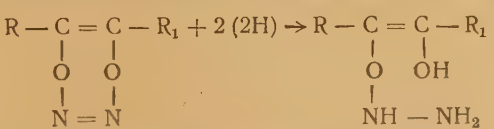
1. В процессе фиксации азота атмосферы азотобактером принимает участие особый катализатор (фермент), имеющий двухкомпонентное строение. В качестве коллоидного носителя выступают специфические белки протоплазмы, а в качестве активной группы участвует соединение, содержащее в своем составе карбоксильную, аминную и две рядом расположенные карбонильные группы. Это соединение является, повидимому, производным дикетоаминоглутаровой кислоты или близкого к ней соединения (например, дикетоаминоадипиновой кислоты).

2. В первой фазе процесса фиксации окислительный потенциал лежит, видимо, около + 100 mV, + 200 mV, а во второй фазе — около —200 mV. Такая разница в потенциале может быть связана только со сменой коллоидного носителя. Поэтому следует допускать, что в разные фазы процесса участвуют разные коллоидные носители. В первой фазе — белок с высоким окислительным потенциалом, а во второй фазе — белок с низким окислительным потенциалом.

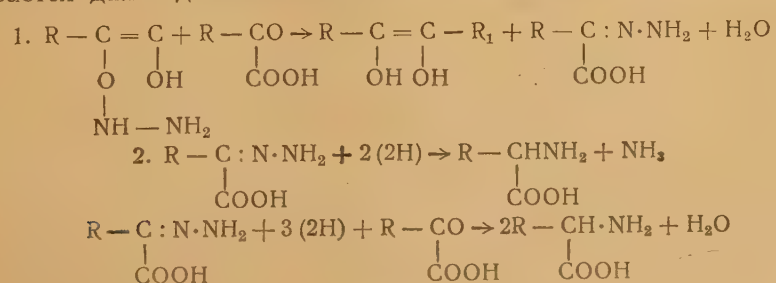
3. Взаимодействие молекулярного азота с карбонильными группами происходит за счет перемены двойной связи между атомами углерода и кислорода на двойную связь между атомами углерода по схеме:



4. После присоединения азота происходит смена коллоидного носителя и начинается восстановление продукта фиксации азота подвижным водородом, мобилизуемым дегидразами из окисляемого органического вещества. При этом восстановлении образуются производные гидразина:



5. Азот от этих соединений акцептируется кетокислотами и восстанавливается далее до аминокислот



6. Аммиак и гидроксиламин образуются только в качестве побочных продуктов при восстановлении гидразинов или же их гидролизе. Поэтому первичное образование этих соединений следует считать исключенным, а вместе с этим исключаются и все теории, принимающие за основу фиксации первичное образование этих продуктов.

Московская сельскохозяйственная академия имени К. А. Тимирязева

Получено 15. V. 1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Сыркин Я. и Дяткина М. Химическая связь и строение молекул. Монография. Госхимиздат, стр. 288, М.—Л., 1946.
2. Федоров М. Влияние аскорбиновой кислоты на фиксацию азота атмосферы азотобактером. ДАН СССР, том 6, № 5, стр. 945, 1949.
3. Федоров М. Двухкомпонентное строение катализатора фиксации азота у азотобактера и физиологический ход процесса фиксации молекулярного азота: ДАН СССР, том 67, вып. 3, стр. 557, 1949.
4. Федоров М. Влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером восстановителей. ДАН СССР, том 67, вып. 4, 1949.
5. Федоров М. Биологическая фиксация азота атмосферы. Монография, Сельхозгиз. 1948.
6. Федоров М. Химизм фиксации азота атмосферы азотобактером. Микробиология XV, вып. 6, 1946.

ФИКСАЦИЯ АЗОТА АТМОСФЕРЫ АЗОТОБАКТЕРОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ АЭРАЦИИ

И. Работнова, Е. Кондратьева, И. Нетте и С. Аронес

Сотни исследователей разных стран в течение полувека всесторонне изучают микроорганизмы, обладающие исключительной способностью питаться газообразным азотом. Этой способностью обладают всего 4 небольшие группы микробов: несколько видов азотобактера, Cl. Pasteurianum, синезеленые водоросли из рода Nostoc и клубеньковые бактерии в симбиозе с бобовыми растениями.

Многие крупнейшие биологи — Виноградский, Омелянский, Костычев, Буткевич, Тимирязев — не оставили без внимания эту проблему.

Несмотря на это, механизм фиксации азота до сих пор остается неизвестным. По трудности изучения этот процесс может быть сравнен с фотосинтезом, механизм которого также трудно поддается изучению.

Существует много очень разнообразных гипотез о механизме фиксации азота, но все они больше исходят из теоретических рассуждений, чем из эксперимента, и ни одна полностью не выдерживает экспериментальной проверки.

Одни исследователи предполагают окисление азота, другие — гидратацию. В последнее время преобладают теории, предполагающие восстановление азота. До сих пор нет ясного представления даже о том, является ли ассимиляция только актом питания или это один из восстановительных процессов в клетке, при котором акцептором водорода является N_2, а самое питание есть уже вторичный процесс — обычное для всех микробов усвоение аммиака или другого соединения азота.

Сейчас по этому вопросу имеются два мнения: Федоров [8] и Burk [10] считают, что азот непосредственно присоединяется к органическому веществу тела и входит в состав аминокислот. Костычев [3] и Виноградский [2] представляли себе фиксацию азота как двухфазный процесс: сперва восстановление N_2 в аммиак, а потом потребление аммиака для построения белка тела обычным для всех микробов путем. Такого же взгляда придерживаются американские исследователи Burris и Wilson и другие [11], работающие с применением так называемых «меченых» атомов азота (изотопов). Ни одна из теорий не доказана исчерпывающим образом.

Ни один из известных фактов не противоречит представлению о том, что азот, активируясь, каким-то образом непосредственно присоединяется к органическому веществу тела.

Но также ничто не противоречит и тому представлению, что азот, являясь акцептором водорода в окислительно-восстановительных реакциях клетки, восстанавливается в аммиак, в чем и заключается исключительная особенность азотфиксаторов. Затем аммиак употребляется для питания, для построения белка обычным путем.

Как можно решить, который путь верен? Если усвоение азота идет по первому пути, то количество фиксированного азота должно быть строго пропорционально количеству вещества тела азотобактера. Сколько фиксировано азота, столько образовалось вещества тела, клеток?

Фиксированный азот $= K \times$ число клеток, где K — коэффициент пропорциональности, $\frac{\text{фиксированный азот}}{\text{число клеток}} = K$ или, другими словами, количе-

ство азота, фиксированного одной клеткой, должно быть величиной постоянной, не зависящей от условий.

Если же фиксация азота и образование белка составляют два различных процесса, то такой зависимости может и не быть.

Весьма вероятно, что эти два процесса идут очень слаженно и азота фиксируется ровно столько, сколько надо. Но можно представить себе, что в каких-нибудь условиях эта слаженность может нарушиться. Например, какие-нибудь условия могут оказаться более благоприятными для образования NH_3 или другого промежуточного продукта и менее благоприятными для роста. Тогда на одну клетку придется больше азота. Таким образом, количество азота на одну клетку в разных условиях может быть различно.

Путь, каким можно решить вопрос о механизме фиксации азота, может быть следующим: изучить фиксацию азота на одну клетку в разных условиях культивирования азотобактера.

Как ни странно, этот вопрос в литературе совершенно не освещен, хотя азотобактер изучали во всевозможных условиях культивирования. Можно взять данные из работ ряда авторов и вычислить эту интересующую нас величину: количество азота, фиксированного на одну клетку.

В работе Блинкова [1] изучалось влияние pH на развитие и азотфиксацию. Он определял урожай по весу и количество фиксированного азота. При пересчете его данных можно видеть, что при разных pH от 6 до 8 на единицу массы клеток фиксируется приблизительно одно и то же количество азота. Так, при pH = 6,18 на 1 мг клеток фиксируется 0,049 мг азота, при pH = 7,15 — 0,044 мг, при pH = 7,35 — 0,044 мг, при pH = 7,79 — 0,043 мг.

В работе Федорова ([8], стр. 278) можно найти данные о росте и азотфиксации в разные периоды развития культуры. Федоров подсчитывал число клеток и количество фиксированного азота в течение 16 дней развития культуры азотобактера. Первый анализ производился через 48 часов и далее каждые два дня. Из его данных можно вычислить количество азота, фиксированного одной клеткой. Приводим результаты этих данных:

Дни	2	4	6	8	10	12	14	16
Количество N, фиксированного одной клеткой в мг	2,8	3,9	3,6	3,7	3,8	3,6	2,8	3,4

В этом случае также можно сказать, что на одну клетку фиксируется одно и то же количество азота, независимо от возраста.

В ряде других опытов Федорова при добавке к культуре самых разнообразных веществ также получается примерно одинаковое количество азота на одну клетку.

Если процессы фиксации и роста являются разными процессами, то протекают они весьма слаженно. Эту слаженность не так-то просто нарушить.

Какие условия могут разладить эти процессы? Очевидно, такие, которые очень существенно могут изменить обмен веществ. Такими условиями в первую очередь могут явиться окислительно-восстановительные.

Все существенные реакции обмена веществ являются окислительно-восстановительными. Теоретически легко себе представить, что эти реакции могут менять свое направление в зависимости от окислительно-восстановительного потенциала среды. В микробиологии имеются и экспериментальные работы, показывающие, как может меняться обмен ве-

ществ у разных микроорганизмов в зависимости от окислительно-восстановительных условий среды.

Окислительно-восстановительные условия среды определяются степенью аэрации, наличием окислителей и восстановителей и наличием окислительных и восстановительных реакций, ведущих к накоплению окислителей или восстановителей. Суммарное окислительно-восстановительное состояние, обусловленное всеми этими причинами, количественно может быть выражено величиной окислительно-восстановительного потенциала, или rh; rh характеризует степень аэробности. rh — это количественная мера аэробности. Шкала от 0 до 41 охватывает все степени аэробности и анаэробности от насыщения среды водородом и до насыщения кислородом, включая сюда и действие окислительных и восстановительных веществ, имеющихся в растворе.

Влияние rh на обмен веществ показано на нескольких объектах, хотя эта область еще мало затронута исследованием. Во всех тех немногих случаях, когда этим вопросом занимались, находили, что если искусственно создавать различные rh для организма, то он реагирует на это резким изменением обмена веществ. Так, Кузнецовым [5] показана зависимость обмена веществ у Aspergillus niger в зависимости от rh. Красиной [4] показана зависимость направления сбраживания муравьиной кислоты от величины rh. По отношению к процессу азотфиксации rh имеет еще и особое значение.

Одним из нас (Работнова, [6]) было найдено, что процесс азотфиксации связан с rh среды. Если азотобактер помещается в одинаковые условия аэрации, но с различными количествами газообразного азота, то в зависимости от количества азота и, следовательно, в зависимости от интенсивности азотфиксации в среде устанавливаются различные rh. Эта работа в конечном счете позволяет сделать такое заключение: если у всех микробов акцепторами водорода могут быть органические вещества, участвующие в обмене, или кислород воздуха, то у азотобактера имеется еще и третий акцептор — азот. Азот активируется азотобактером.

Эти наблюдения привели к мысли, что окислительно-восстановительные условия — это те условия, которые могли бы нарушить согласованность процесса фиксации и процесса роста.

Нами была поставлена задача: изучить фиксацию азота азотобактером в пересчете на одну клетку при разных rh.

Методика

Азотобактер в жидкой среде развивается в виде пленки. По нашим наблюдениям и по данным Рыбалкиной [7], под пленкой создаются довольно анаэробные условия; rh спускается до 10 и ниже. С поверхности пленка соприкасается с воздухом и, следовательно, находится в аэробных условиях. Неизвестно, в каких же условиях аэрации клетки наилучшим образом развиваются и фиксируют азот. Решить этот вопрос можно только при непрерывном перемешивании среды, когда все клетки погружены в жидкость и находятся в одинаковых условиях.

Наши опыты были поставлены в специальном сосуде, в котором через среду непрерывно продувались газовые смеси, содержащие различное количество кислорода. Пузырьками газа среда непрерывно перемешивалась, и клетки азотобактера были равномерно распределены во всей толще среды.

Опытный сосуд представляет собой стеклянную трубку 30 см длины и 2 см в диаметре, емкостью в 70 мл. В трубку вплавлены три электрода для определения rh среды. Нижняя часть трубки сужена и заполняется электропроводным материалом: гипсом или асбестом, пропитанным раствором хлористого калия, и 3% агаром, приготовленным на 5% растворе KCl. Через этот материал осуществляется контакт с каломелевым электродом при электрометрическом определении окислительно-восста-

новительного потенциала. Сосуд закрывается каучуковой трубкой, через которую пропущен термометр, погруженный в среду, трубка, доходящая до дна, подводящая газовую смесь, и короткая трубка, отводящая газ.

Газовые смеси, продуваемые через суспензию азотобактера, имели следующий состав: $^1/_4$ воздуха + $^3/_4$ кислорода, воздух, $^3/_4$ азота + $^1/_4$ воздуха. Газовая смесь помещалась в бутыль емкостью в 20 л. Бутыль соединялась посредством каучуковой трубки с описанным выше прибором, а с другой стороны — бутылью с водой, помещенной на более высоком уровне. При открывании зажима на каучуке, соединяющем обе бутыли, вода переливалась в бутыль с газом, вытесняя последний и заставляя его поступать в прибор. При этом газ предварительно проходил через промывалку с 5% H_2SO_4 для очищения от возможной примеси аммиака и через ватный фильтр, что обеспечивало стерильность среды. Опыты ставились в стерильных условиях — прибор со средой стерилизовался в автоклаве. Опыт велся в термостате, подогреваемом маленькой горелкой таким образом, чтобы температура в среде поддерживалась постоянно на уровне 29—30°. Вследствие того что весьма затруднительно пропускать газовые смеси круглосуточно, мы были вынуждены вести кратковременные опыты не более 12 часов. В связи с этим в начале опыта мы сразу брали довольно густую суспензию клеток.

Предварительными опытами было установлено, что культура, содержащая 10—20 млн. клеток в 1 мл, за короткий опыт не успевает фиксировать достаточное количество азота для того, чтобы его можно было точно определить методом микро-Кьельдаля. Мы остановились на первоначальной концентрации в 30—50 млн. в 1 мл и во всех опытах старались по возможности создавать одну и ту же начальную концентрацию. Эта густота суспензии относительно не велика, так как азотобактер может нарастать в жидкой среде до нескольких сотен миллионов на миллилитр. Азотобактер выращивался на твердой среде Эшби, перед началом опыта клетки смывались с субстрата жидкой средой Эшби и приготовлялась суспензия требуемой концентрации. Опыты велись на среде Эшби с добавлением молибденовокислого натрия. pH среды в начале и в конце равнялся 7,0—7,2. Число клеток до и после опыта просчитывалось в камере Тома. Азот определялся в среде в начале и в конце опыта методом микро-Кьельдаля. Максимальная ошибка определения составляет 0,7 мг азота на 100 мл среды, что соответствует 0,05 мл 0,032 *N* щелочи при титровании из микробюретки. В каждом опыте велось 2—4 параллельных определения в начале и в конце опыта. Окислительно-восстановительный потенциал в суспензии азотобактера зависит от количества кислорода, растворенного в среде. Растворимость кислорода в воде при 30° невелика. При продувании через приборчик 12 л воздуха за 6 часов в стерильной среде устанавливается rH = 26 — 27 (Eh = 400 mV). При продувании смеси воздуха с кислородом rh не повышается выше 30. Бактерии поглощают кислород, поэтому в суспензии бактерии при продувании воздуха rh ниже и равняется 21—23 в зависимости от густоты суспензии: чем гуще суспензия, тем ниже rh. Таким образом, rh в суспензии азотобактера характеризует соотношение насыщения среды кислородом и скорости потребления растворенного кислорода клетками. При достаточной скорости продувания газа (не менее 30 л за 9 часов) можно поддерживать rh суспензии почти на одном и том же уровне в течение всего опыта, причем величина rh зависит от количества кислорода в газовой смеси. Сдвиги rh в одном опыте и различие в показаниях отдельных электродов не превышали двух единиц rh, а чаще были еще меньше. К концу опыта всегда rh немного снижается. Измерения rh велись каждые один-два часа. На основании полученных данных вычислялась фиксация азота на 100 мл суспензии при данном rh, относительный прирост клеток, т. е. во сколько раз увеличилось число клеток к концу опыта, и фиксация азота на одну клетку, т. е. от-

ношение количества азота к среднему числу клеток. Если считать, что азот тратится только на построение белка, то тогда вычисление количества азота, приходящегося на одну клетку, следует делать не на среднее число клеток, а на прирост. Этот расчет также был сделан.

Экспериментальная часть

В первой серии опытов был использован Azotobacter chroococcum штамм № 54. С этим штаммом была поставлена серия опытов длительностью 9 часов с продуванием указанных выше смесей воздуха с азотом и кислородом. Результаты опытов представлены в табл. 1.

В таблице приведено среднее значение rh и Eh за время опыта. При продувании воздуха и смеси воздуха с кислородом в среде устанавливается rh от 20 до 25. Мы пытались увеличить окислительно-восстановительный потенциал, добавляя к суспензии клеток 5% раствор перекиси водорода. Перекись вносилась по каплям при постоянном перемешивании среды воздухом. Добавление одной капли перекиси увеличивало rh с 24 до 30 (Eh с +290 до +464). Затем потенциал постепенно падает. Для поддержания потенциала на одном уровне по мере необходимости вносились новые количества перекиси, так что среднее значение окислительно-восстановительного потенциала составляло 27—28. Всего было внесено 1,3 мл перекиси. Опыты ставились повторно. Как видно из табл. 1, в присутствии перекиси водорода азотобактер не размножался и не фиксировал азота. Однако при высеве на чашки после опыта рост был.

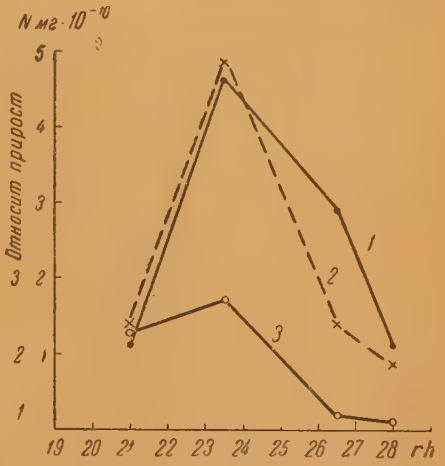


Рис. 1. **Фиксация азота и прирост клеток при разных rh**

1 — фиксация N на среднее количество клеток; *2* — фиксация N на прирост клеток; *3* — относительный прирост

Эта серия опытов показывает, что различные rh в интервале 20—27 или Eh от +174 до +406 mV существенным образом влияют на жизнедеятельность азотобактера. Оптимальным для фиксации азота является очень узкая зона rh = = 22—25. При более высоких rh угнетается и размножение и фиксация. При более низких rh фиксация угнетается сильнее, чем развитие. Количество фиксированного азота в пересчете на одну клетку различно в разных условиях. Во второй серии аналогичных опытов был использован Az. agile № 22-Д.

Результаты приведены в табл. 2. и на рис. 1. Az. agile имеет то преимущество перед Az. chroococcum, что о его состоянии можно судить по подвижности клеток. Во всех опытах клетки были подвижны, даже при высоком rh = 27, когда и развитие и фиксация азота были ослаблены. Результаты оказались совершенно аналогичными с теми, что мы наблюдали в опытах с Az. chroococcum 54. При разных rh фиксация азота на одну клетку была различной. При более низких rh прирост клеток угнетается меньше, чем фиксация азота.

Следует отметить, что подсчет клеток не вполне удовлетворительный метод учета урожая, так как при этом не принимается во внимание величина клеток, которая может различаться. Так как мы не имели возможности определить массу прямым методом, мы решили определить фиксацию азота в расчете не только на одну клетку, но и на количество использованного углевода. Для этого мы ставили опыты на среде

Таблица 1

Фиксация азота и размножение клеток Az. chroococcum штамм № 54 при различных rh среды

Состав газовой смеси	Количество газовой смеси в л	Eh среды в mV	rh	Количество клеток в 1 мл в млн.				Относительный прирост	Количество азота в 100 мл в мг			Фиксация азота 1 клеткой в мг $\cdot 10^{-10}$	
				начальное	конечное	прирост	среднее		начальное*	конечное *	прирост	на среднее количество	на прирост
Воздух	20	174	20	41	97	56	69	2,3	2,2	3,1	0,9	1,3	1,6
»	20	189	20,5	23	70	47	47	2,9	1,8	2,4	0,6	1,3	1,3
»	60	247	22,5	37	83	46	60	2,2	1,5	4,0	2,5	4,2	5,4
$^3/_4$ O_2 + $^1/_4$ воздуха . .	20	261	23	56	144	88	100	2,4	1,0	5,4	4,4	4,4	5,0
$^3/_4$ O_2 + $^1/_4$ » . .	20	284	23,8	27	63	36	45	2,3	1,4	3,2	1,8	4,0	5,0
$^3/_4$ O_2 + $^1/_4$ » . .	40	290	24	38	136	98	87	3,5	1,1	4,5	3,4	3,8	3,5
$^3/_4$ O_2 + $^1/_4$ » . .	60	319	25	70	144	74	107	2,0	1,8	5,8	4,0	3,7	5,4
Воздух + 0,3 мл H_2O_2 .	20	377	27	57	49	0	54	1,0	2,2	2,2	0	0	0
Воздух + 0,3 мл H_2O_2 .	40	406	28	45	44	0	44	1,0	1,46	1,46	0	0	0
Воздух + 0,3 мл H_2O_2 .	60	406	28	46	56	10	51	1,2	1,9	2,0	0,1	0,2	0,1

* В этих столбцах приведено среднее из весьма близко совпадающих 2—4 параллельных анализов.

Таблица 2

Фиксация азота и размножение Az. agile при различных rh среды

Состав газовой смеси	Eh	rh	Число клеток в 1 мл в млн.				Относительный прирост	Количество азота в 100 мл среды в мг			Фиксация азота 1 клеткой в мг $\cdot 10^{-10}$	
			начальное	конечное	прирост	среднее		начальное	конечное	прирост	на среднее количество	на прирост
$^3/_4$ O_2 + $^1/_4$ воздуха	203	21	44	100	56	72	2,3	2,2	3,0	0,8	1,1	1,4
Воздух	+ 284	23,5	38	103	65	70	2,7	2,4	5,1	3,2	4,6	4,9
$^3/_4$ O_2 + $^1/_4$ воздуха	362	26,5	45	55	10	50	1,2	1,9	3,3	1,4	2,8	1,4
$^3/_4$ O_2 + $^1/_4$ воздуха	377	27	56	64	8	61	1,1	1,8	2,5	0,7	1,1	0,9

Эшби с заменой маннита глюкозой для того, чтобы можно было определять сахар методом Бертрана. Предварительные опыты показали, что для того, чтобы за короткий опыт клетки достаточно энергично развивались, необходимо и культуру перед опытом поддерживать на глюкозе. Несмотря на это, на глюкозе все же развитие было несколько более медленным, чем на манните. Поэтому опыты были удлинены до 12 часов. Оказалось, что в препарате глюкозы содержится небольшое количество азота — 1,55 мг на 100 мл 1% раствора. Хотя оно и было очень невелико, но фиксация азота задерживалась в первые часы развития культуры. Этот азот не удалялся из раствора глюкозы при встряхивании его с активированным углем в течение двух часов. Поэтому мы прибегли к следующему приему. Культура подготавливалась для опыта в жидкой среде с 1% глюкозы, налитой в колбы тонким слоем. В этих условиях число клеток за два-три дня достигало 150—200 млн. на 1 мл. За 10—12 часов до начала опыта такая суспензия разбавлялась свежей средой в несколько раз, и к началу опыта азотобактер успевал использовать имеющийся в среде азот. Результаты приведены в табл. 3 и на рис. 2.

Из табл. 3 можно видеть, что количество азота, фиксированного на 1 г использованного сахара, различно при различных rH среды. Аналогичная серия опытов была поставлена и с Az. agile. Длительность опытов 10 часов. Результаты представлены в табл. 4.

Для получения более низких rh мы пробовали продувать один азот из баллона, содержащий 1% кислорода. За все 10 часов было пропущено всего 2 л газа. Снижение rh было небольшим по сравнению с опытами с продуванием азота и воздуха. Это, возможно, объясняется тем, что воздух мог соприкасаться со средой с поверхности, так как он мог проходить через газоотводную трубку. Однако при этом rh не было ни развития, ни фиксации азота, хотя азотобактер сохранял подвижность. Кроме того, для получения более низких rh в одном опыте мы прибавили один из самых сильных восстановителей — гидросульфит в виде 10% раствора. Воздух продувался для перемешивания среды. Однако в таких условиях добавление гидросульфита до концентрации его в среде 1,08% не снизило rh ниже 20, а клетки потеряли подвижность и деформировались. Эта серия опытов подтвердила предыдущие: количество азота, фиксированного на одну клетку и на 1 г использованного сахара, закономерно изменялось с изменением rh среды. Аналогичные серии опытов ставились нами неоднократно. Все без исключения дали те же результаты. Поэтому здесь приведены не все имеющиеся данные.

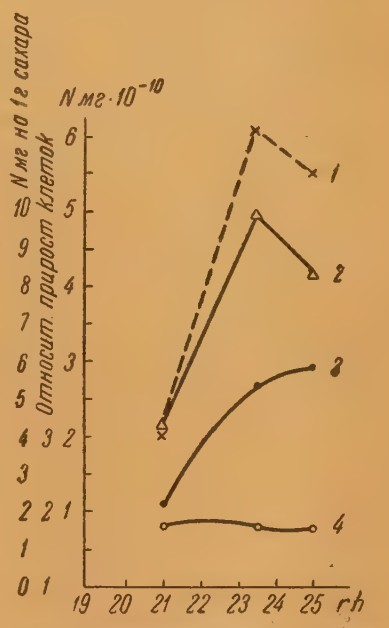


Рис. 2. Фиксация азота в пересчете на одну клетку и на 1 г потребленного сахара при разных rh.

1 — фиксированный N на прирост клеток; *2* — N мг на 1 г сахара; *3* — фиксированный N на среднее количество клеток; *4* — относительный прирост

Таким образом, установлено, что количество азота, приходящееся на одну клетку, различно при разных условиях культивирования. Трудно предположить, что меняется состав тела бактерий. Как известно, состав обычно довольно постоянен. Остается думать, что мы имеем дело с образованием промежуточного продукта азотфиксации, который в большей или меньшей степени накапливается в среде. Так как мы определяли

Таблица 3

Фиксация азота, размножение клеток и потребление сахара в культуре Az. chroococcuum штамм № 54 при различных rh среды

Состав газовой смеси	Eh в mV	rh	Число клеток в 1 мл в млн.				Относительный прирост	Количество глюкозы 100 мл в мг			Количество азота в 100 мл среды в мг			Фиксация азота 1 клеткой в мг×10^{-10}		Фиксация азота на 1 г использов. сахара в мг
			начальное	конечное	прирост	среднее		начальное	конечное	потребление	начальное	конечное	прирост	на среднее количество	на прирост	
Воздух	203	21	45	80	35	62	1,8	903	735	168	2,2	2,9	0,7	1,1	2,0	4,2
$^3/_4$ O_2 + $^1/_4$ воздуха	224	23,5	32	50	18	41	1,7	984	871	113	1,9	3,0	1,1	2,7	6,1	9,9
$^3/_4$ O_2 + $^1/_4$ воздуха	319	25	31	53	22	42	1,7	1 140	995	145	1,2	2,4	1,2	2,9	5,5	8,3

Таблица 4

Фиксация азота, размножение клеток и потребление сахара в культуре Az. agile при различных rh среды

Состав газовой смеси	Eh mV	rh	Число клеток в 1 мл в мин.			Относительный прирост	Количество глюкозы в 100 мл в мг			Количество азота в 100 мл среды в мг			Фиксация азота 1 клеткой в мг × × 10^{-10}	Фиксация азота на 1 г использ. сахара в мг
			начальное	конечное	среднее		начальное	конечное	потребление	начальное	конечное	прирост		
2 л азота с 1% кислорода	174	20	46	47	46,5	1,0	953	939	14	1,78	1,79	0	0	0
Воздух + гидросульфит	203	21	59	59	23	1,0	830	826	4	1,83	1,83	0	0	0
$^3/_1$ азота + $^1/_4$ воздуха	203	21	48	66	57	1,4	731	636	95	1,9	2,9	1,0	1,7	10,5
Воздух	261	59	40	96	68	2,4	744	598	146	1,7	3,7	2,0	3,0	13,7
$^3/_4$ кислорода + $^1/_4$ воздуха	377	27	44	50	46	1,2	922	744	178	2,1	2,6	0,5	1,1	2,8
Воздух + H_2O_2	464	30	45	44	44,5	1,0	752	732	20	2,2	2,2	0	0	0

азот в среде вместе с бактериями, то этот вопрос остался нерешенным. Виноградский и Костычев предполагают, что таким продуктом является аммиак. Однако наши попытки обнаружить аммиак реактивом Несслера не увенчались успехом. Аммиака мы не обнаружили.

По новейшим исследованиям Шапошникова [9] с бродильными организмами видно, что в процессе развития этих организмов происходит изменение обмена веществ. В первые часы жизнедеятельности организм строит из полученного сахара вещество своего тела. В это время происходит интенсивное размножение микроорганизмов. Так как сахар вещество более окисленное, чем вещество тела — белок, то и в среде в качестве продуктов брожения остаются вещества, более окисленные, так как водород идет на построение белка. Когда же рост замедляется, в среде образуются более восстановленные вещества. Таким образом, окислительно-восстановительный баланс в культуре меняется с возрастом, причем изменения обычно имеют место в первые часы брожения. По аналогии возникло предположение, что и у азотобактера возможна смена различных фаз обмена веществ. Если азотфиксация входит в окислительно-восстановительный баланс обмена веществ, если азот является акцептором водорода, то изменения в окислительно-восстановительном балансе должны отразиться на фиксации азота.

Для проверки этого предположения были поставлены опыты с Az. agile с учетом развития и фиксации азота по ходу развития культуры.

Опыт был поставлен в том же приборчике, что и предыдущие опыты. Через культуру непрерывно продувался воздух. Каждые 6 часов отбирались пробы для определения азота и количества клеток. Опыт велся на среде Эшби с маннитом. За время опыта — 30 часов — rh постоянно снижался с 24 до 20. Результаты приведены в табл. 5, откуда видно, что количество азота в пересчете на одну клетку меняется с возрастом. В первые моменты развития азота на одну клетку приходится меньше, чем в последующие. Можно предположить, что сначала азотобактер

Таблица 5

Фиксация азота и размножение клеток Az. agile за первые 30 часов развития культуры

Часы	Количество клеток в 1 мл в млн.	Относительный прирост	Количество азота в 100 мл в мг		Фиксация азота 1 клеткой в мг $\times 10^{-10}$
			общее	прирост	
0	28,0	—	1,79	—	—
6	50,4	1,6	2,24	0,45	0,9
12	72,8	2,6	2,38	0,59	0,82
18	138	4,8	3,58	1,79	1,30
24	160	5,7	5,08	3,29	2,05
30	232	8	6,87	5,08	2,20

очень экономно фиксирует азот, так как водород потребляется в конструктивном метаболизме. Позднее можно допустить образование восстановленного промежуточного продукта.

Этот опыт был поставлен повторно. Во второй раз фиксация азота на одну клетку через 8 часов равнялась $2{,}5 \cdot 10^{-10}$ мг, через 13 часов — $3{,}0 \cdot 10^{-10}$ мг, через 27 часов — $3{,}2 \cdot 10^{-10}$ мг. Оба эти опыта следует рассматривать лишь как предварительные. Необходимо детальное исследование динамики развития культуры азотобактера. Однако эти опыты подтвердили наше предположение о том, что фиксация азота и рост клеток представляют собой два различных процесса. Следует подчеркнуть, что мы наблюдали развитие культуры в течение первых 30 часов.

В приведенных выше опытах Федорова исследовались более поздние стадии развития. Первый анализ был сделан им через 48 часов после начала развития культуры. Возможно, что на более поздних стадиях развития, которые наблюдал Федоров, скорость размножения не велика и поэтому не отражается на окислительно-восстановительном балансе. Поэтому количество азота, фиксированное одной клеткой, постоянно.

Выводы

1. При продувании различных газовых смесей через культуры азотобактера на жидкой среде создаются различные окислительно-восстановительные условия, количественно измеряемые rh. При продувании смеси $^3/_4$ азота и $^1/_4$ воздуха rh = 20—21. При продувании воздуха rh=22—23. При продувании смеси $^3/_4$ кислорода + $^1/_4$ воздуха rh = 25—27.

2. На эти различные окислительно-восстановительные условия азотобактер реагирует изменениями в интенсивности размножения. Наибольшая интенсивность размножения наблюдается при rh = 21—24: При более высоких rh размножение угнетено.

3. Интенсивность фиксации азота при rh = 20—21 и выше rh = 25 очень невелика. При rh = 22—24 — наибольшая.

4. Фиксация азота в пересчете на одну клетку различна при разных rh. При rh = 20—21 и 25—28 она ниже, чем при rh = 23—24.

5. То же самое наблюдается и при пересчете количества фиксированного азота на 1 г использованного сахара.

6. Интенсивность азотфиксации в пересчете на одну клетку зависит от возраста культуры. В первые фазы развития наблюдается более слабая азотфиксация, хотя происходит интенсивное размножение. Через 18 часов культивирования количество азота, фиксированного на одну клетку, возрастает.

7. Все указанные факты свидетельствуют о том, что размножение и фиксация азота — два различных процесса. Можно предположить, что сперва идет фиксация азота и образование промежуточного продукта, а затем потребление этого продукта. Промежуточный продукт не является аммиаком, так как не обнаруживается реактивом Несслера.

Кафедра микробиологии
Московского государственного университета

Получено 29. VI. 1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Блинков В. Г. Влияние реакции среды на интенсивность азотфиксации и рост азотобактера. Микробиология, XVI, вып. 1, 1948.
2. Виноградский С. Sur l'origine de l'ammoniac dégagé par les fixateurs d'azote. Ctbl. Bakt., II Abt., **97**, 399, 1938.
3. Костычев С. П. Физиология растений, ч. 1, стр. 214, 1933.
4. Красина Н. Н. Физиология бактерий, разлагающих муравьиную кислоту с образованием газа. Микробиология, V, 669, 1936.
5. Кузнецов С. И. Сдвиги окислительно-восстановительных процессов у Asp. niger в связи с изменением потенциала среды. Микробиология, 1, 1932.
6. Работнова И. Л. Окислительно-восстановительный потенциал среды в связи с усвоением молекулярного азота. Микробиология, X, вып. 5, 1941.
7. Рыбалкина А. В. Связь между окислительно-восстановительным потенциалом в культурах Azotobacter и стадиями его развития. Микробиология, VI, вып. 3. 1937.
8. Федоров М. В. Биологическая фиксация азота атмосферы. Москва, 1948.
9. Шапошников В. Н. и Семенова В. А. О материальной зависимости процессов энергетического и конструктивного обмена веществ у бактерий. Микробиология XVIII, вып. 2, 1949.
10. Burk D. Azotaze and nitrogenase in Azotobacter. Erg. Enzym. III, 23, 1934.
11. Burris B. H. and Wilson P. W. Ammonia as an intermediate in nitrogen fixation by Azotobacter. J. Bact., **52**, No. 5, 1946.

ЛИШАЙНИКИ И ЦЕЛЛЮЛОЗОРАЗРУШАЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Д. М. Новогрудский

I

Первыми поселенцами на выходах скальных пород (гранитах, гнейсах, известняках) являются автотрофные водоросли и бактерии. Одновременно или вслед за ними поверхность горных пород заселяется некоторыми видами гетеротрофных грибов и бактерий, а также лишайниками. С точки зрения массы живого вещества и глубины биогенных превращений, первое место среди перечисленных организмов занимают лишайники. Они изменяют поверхность горных пород в двух отношениях: 1) таллом лишайника механически и химически раздробляет поверхность породы и превращает ее в мелкодисперсную массу; 2) измельченная масса породы обогащается гумифицированным органическим веществом лишайниковых тел. В результате обоих процессов возникает одно из наиболее примитивных почвенных образований — лишайниковый мелкозем, в котором уже созданы условия для развития более требовательных растительных форм — мхов и высших растений.

Образование гумусовых веществ из тел лишайников является важным процессом в развитии на земле жизни и процессов почвообразования. Но механизм этого процесса остается неясным. В настоящее время известен только один путь превращения живых растительных тел в гумусовые вещества. Он заключается в следующем. Растительные тела умирают и разлагаются микроорганизмами. В этом процессе значительная роль принадлежит целлюлозоразрушающим микробам. В результате его часть органического вещества растительных остатков трансформируется в протоплазму микробных тел. Продукты автолиза микробных тел и неразложенных растительных остатков дают начало веществам гумуса.

Имеются основания предполагать, что гумификация органического вещества лишайников происходит аналогичным образом. В талломе лишайника имеются в большем или меньшем количестве мертвые гонидии. По Еленкину (1912), в гонидиальной сфере гетеромерного лишайника наблюдается особая зоонекральная зона, в которой гонидии находятся в разных стадиях отмирания, сопровождаемого исчезновением протоплазменного содержимого. Под ней расположена эпинекральная зона, состоящая почти исключительно из мертвых оболочек водорослевых гонидий. Эти мертвые оболочки состоят преимущественно из целлюлозы, и их распад может происходить только под воздействием целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Возникает вопрос: откуда берутся эти целлюлозоразрушающие микроорганизмы? Ни на поверхности скальных пород, ни в воздухе они не могут находиться. Напрашивается ответ, что целлюлозоразрушающие микроорганизмы, участвующие в гумификации отмерших элементов лишайниковых тел, содержатся внутри или на поверхности самого лишайника. Изложенный ход мыслей приводит к представлению, что целлюлозоразрушающие микроорганизмы ассоциированы с лишайником и в течение всей жизни последнего производят распад отмирающих гонидий.

Таким образом, возникло настоящее исследование о целлюлозоразрушающих микробах в талломах лишайников.

II

Исследование произведено с 16 образцами лишайников, названия которых и место сбора представлены в табл. 1.

Таблица 1

Список исследованных образцов лишайников и их происхождение

№ образца	Название лишайника	Место сбора
	I группа	
3	Aspicilia alpino-desertorum Elenk. f. fruticuloso-foliacea Elenk.	Центральный Тянь-Шань. Район ледника Колпаковского. Абс.выс. до 4000 м. На сыртах
4	Peccania coralloides Mass,	Там же. На выходах известняка
5	Squamaria (Placodium) sp.	Северные склоны Терскей-Алатау. Абс. выс. 3900—3600 м. На выходах гранодиоритов
6	Umbilicaria hirsuta Asch. f. vestita	Там же. Абс. выс. 2600—2700 м. На гранитах
7	Lecidea lapicida	Там же. Абс. выс. 3600—3900 м. На гранитах
10	Caloplaca sp.	Там же. Абс. выс. 2600—2700 м. На гранитах
13	Endocarpon ascendens (Auzi) Mull. Arg.	Центральный Тянь-шань. Район ледника Колпаковского. На известняках
16	Aspicillia sp.	Северные склоны Терскей-Алатау. Абс. выс. 3600—3900 м. На гранодиоритах
	II группа	
17	Aspicilia alpino-desertorum Elenk. f. typica Elenk.	Тургайское плато. В 143 км к северу от Кзыл-Орды. На гальке среди зарослей Anabasis salsa
18	Collema (Pulposum ?)	Там же. На поверхности почвы
19	Aspicilia alpino-desertorum Elenk. f. typica Elenk.	Там же. Полынно-анабазисная пустыня. На гальке.
20	Placodium cerodes (Nyl.) Elenk.	Пустынные почвы к северу от Кзыл-Орды. На стеблях Salsola arbuscula.
21	Candelariella cerinella var. unicularis Elenk.	Там же. На поверхности почвы
25	Placodium cerodes (Nyl.) Elenk.	Такыр. В 1 км к востоку от Каныр-Тюбе (к северу от Кзыл-Орды). На стеблях Salsola rigida
27	Candelariella cerinella var. unilocularis Elenk.	Полынно-анабазисная пустыня на третичном плато. В 140 км к северу от Кзыл-Орды. На песчанике
20	Aspicilia calcarea (L.) Roeb.	Там же. На песчанике

Образцы 3, 17, 18, 20, 21, 25, 27, 29 определены В. П. Савичем (Ленинград). Остальные образцы определены С. Р. Шварцман (Алма-Ата). Указанным лицам автор приносит глубокую благодарность.

Из этих лишайников 8 собраны в высокогорных областях на выходах скальных пород: гранитах (образцы 3, 6, 7, 10) гранодиоритах (образцы 5, 16) и известняках (образцы 4, 13). Другие 8 образцов собраны в равнинной местности: на поверхности почвы (образцы 18, 21), на выходах песчаника (образцы 27, 29), на коре кустарников (образцы 20, 25), на гальке (образцы 17 и 19).

Наибольший интерес для настоящего исследования представляли прежде всего 8 образцов высокогорных лишайников (I группа) с по-

верхности скальных пород. Эти лишайники не соприкасались с почвой, и поэтому здесь не могло быть оснований опасаться механического перенесения почвенных целлюлозоразрушающих микробов на поверхность лишайникового таллома. Из равнинных лишайников (II группы) особый интерес представляли образцы 17 и 19 (Aspicilia alpino-desertorum), у которых каждый таллом располагался на отдельном обкатанном камешке. Образованный этими камешками галечник на большом пространстве покрывал поверхность почвы. Вследствие этого имелась возможность сравнить целлюлозоразрушающие микроорганизмы почвы и находящейся на ее поверхности галечника с телами аспицилии.

Образцы первой группы лишайников исследовались приблизительно спустя 6—8 месяцев после их сбора, а образцы второй группы — через один-два месяца. Выделение целлюлозоразрушающих микробов из лишайниковых талломов производилось на агаровой азотно-минеральной среде следующего состава: дестиллированная вода — 1000 мл; фосфорнокислый калий (одно- или двузамещенный) — 1,0 г; хлористый калий 0,1 г; сернокислый магний — 0,3 г; хлористый натрий — 0,1 г; хлористое железо — 0,01 г; азотнокислый калий (или сернокислый аммоний) — 2,5 г; агар-агар — 15 г. Эта питательная среда разливалась в чашки Петри и покрывалась стерильными кружками фильтровальной бумаги. Поверх бумаги раскладывали 10—15 маленьких кусочков таллома исследуемого лишайника. Засеянные чашки помещали в опрокинутом положении в термостат при 28°. Через некоторое время вокруг высеянных кусочков таллома развивались микроорганизмы, быстро разрушающие бумагу и окрашивающие ее в разные цвета. Эти организмы изолировались в виде чистых культур и подробно изучались. Для создания в этих опытах более разнообразных условий, обеспечивающих возможность развития более широкому кругу целлюлозоразрушающих микробов, основная азотно-минеральная среда варьировалась путем замены K_2HPO_4 на KH_2PO_4, а также KNO_3 на $(NH_4)_2SO_4$. Наилучшее развитие целлюлозоразрушающих микробов из лишайниковых талломов происходило на среде с K_2HPO_4 и с KNO_3 в качестве источника азота. На других вариантах питательных сред развивались те же виды организмов, но менее интенсивно.

III

Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Целлюлозоразрушающие микроорганизмы из лишайниковых талломов

№ обр. лишайника	Globotrys sp.	Chaetomium subterraneum	Chaetomium funicola	Chaetomium globosum	Chaetomium spirale	Chaetomium sp.	Thielavia terricola	Cellvibrio sp.	№ обр. лишайника	Globotrys sp.	Chaetomium subterraneum	Chaetomium funicola	Chaetomium globosum	Chaetomium spirale	Chaetomium sp.	Thielavia terricola	Cellvibrio sp.
	I группа									II группа							
3	+	—	—	—	—	—	—	—	17	+	—	—	—	—	+	—	+
4	+	—	—	—	—	—	—	—	18	—	+	+	—	—	—	+	+
5	+	—	—	—	—	—	—	—	19	—	—	+	+	—	—	+	—
6	+	—	—	—	—	—	—	—	20	—	—	—	—	—	—	+	+
7	+	—	—	—	—	—	—	—	21	+	+	—	+	—	—	+	+
10	+	+	—	—	—	—	—	—	25	—	—	—	—	—	—	+	+
13	—	+	—	—	—	—	—	—	27	+	—	—	—	—	—	—	+
16	—	—	—	—	—	—	—	—	29	+	—	—	—	—	+	—	—

Из данных табл. 2 могут быть сделаны следующие выводы:

1. Во всех исследованных 16 образцах лишайников (за исключением образца 16) содержатся целлюлозоразрушающие микроорганизмы.

2. Целлюлозоразрушающие микробы лишайниковых талломов относятся к трем родам грибов: Gliobotrys, Chaetomium и Thielavia. Одновременно с этими грибами в них могут находиться аэробные целлюлозоразрушающие бактерии из рода Cellvibrio.

3. Литофильные лишайники высокогорных областей, произрастающие на скальных породах, содержат, как правило, только целлюлозоразрушающий гриб Gliobotrys и редко Chactomium (обр. 10 и 13). Наоборот, лишайники равнинных областей редко содержат Gliobotrys, но в них обильно представлены Chaetomium, Thielavia и Cellvibrio.

4. Высокогорные литофильные лишайники содержат, как правило, один вид целлюлозоразрушающего организма, в равнинных лишайниках число видов больше и доходит до четырех.

Из перечисленных организмов Gliobotrys sp. и виды Chaetomium часто встречаются в почвах Казахской ССР, где они являются активными разрушителями целлюлозы. Thielavia terricola в почвах не установлена.

IV

Дальше возник следующий вопрос: находятся ли целлюлозоразрушающие грибы на поверхности лишайникового таллома или внутри него? Для выяснения этого вопроса отдельные гальки с лишайником № 17 (Aspicilia alpino-desertorum) последовательно отмывались в колбочках со стерильной водой 4 раза по 30 минут. После этого галька с лишайником захватывалась стерильным пинцетом и погружалась в этиловый спирт на 10 минут. Стерильным пинцетом галька с лишайником извлекалась из спирта и избыток последнего поджигался. После такой стерилизации поверхности лишайникового таллома раздробленные частицы последнего помещали на указанную выше питательную среду с кружочками фильтровальной бумаги, а также (для проверки стерильности) в мясопептонный бульон. Одновременно были сделаны такие же посевы из нестерилизованного таллома. На посеве из нестерилизованного таллома развился на фильтровальной бумаге только Chaetomium, а на посеве таллома стерилизованного развился тот же Chaetomium и, кроме того, Gliobotrys. Однако контрольные посевы стерилизованного таллома в пробирки с питательным бульоном оказались нестерильными. В них развилась споровая бактерия, сохранившая жизнеспособность, несмотря на довольно жесткий режим стерилизации. Поэтому описанный опыт не может служить для решения вопроса о локализации целлюлозоразрушающих грибов в талломе лишайника.

Некоторое время спустя опыт был повторен. На этот раз галька с лишайником после ее предварительного троекратного промывания в стериальной воде погружалась на 1; 5; 10; 20; 30 минут в 1% раствор брома, после чего тщательно обмывалась стерильной водой и кусочки таллома высевались в пробирки с мясопептонным бульоном. Все части лишайника, обработанные бромом в течение 1 и 5 минут, оказались нестерильными. Обработанные же в течение 10, 20 и 30 минут оказались стерильными и не вызвали в мясопептонном бульоне ни малейшего помутнения. После этого испытания те же кусочки таллома из пробирок с прозрачным бульоном переносились в чашки Петри с питательным минеральным агаром, покрытым кружочками фильтровальной бумаги. В этих условиях целлюлозоразрушающие грибы совершенно не развивались, но вокруг ряда частичек лишайникового таллома (притом во всех вариантах обработки бромной водой: 10, 20, 30 минут) медленно, в течение 15—20 дней, развилась целлюлозоразрушающая бактерия (Cellvibrio), образующая на бумаге светложелтые пятна.

Таким образом, необходимо признать, что целлюлозоразрушающие грибы расположены, повидимому, только на внешних поверхностях лишайникового таллома, а также в контактной зоне, где тело лишайника

соприкасается с субстратом. Во внутренних же частях лишайникового таллома обитает целлюлозоразрушающая аэробная бактерия из рода Cellvibrio.

V

Так как многие из перечисленных целлюлозоразрушающих грибов, живущих в лишайниковых талломах, впервые указываются для СССР, приводим краткое их описание.

Gliobotrys sp. На картофельно-сахарном агаре и на жидкой минеральной среде с фильтровальной бумагой культуры бархатисточерные. Гифы бесцветные, тонкие, 2—3 μ в поперечнике. Конидиеносцы буроокрашенные, прямые, простые, редко разветвленные, 3,0—3,5 μ в поперечнике, до 120 μ длиной. На концах конидиеносцев 6—8 обратнояйцевидных стеригм, 6 × 12 μ бесцветных или бурых, несущих одиночные темноокрашенные, овальные, одноклетные споры 5—6 × 6—7,5 μ. Споры каждого конидиеносца окружены черной слизью в общую головку. При росте на жидкой минеральной среде с фильтровальной бумагой гриб окрашивает субстрат в буро-коричневый цвет. Описываемый организм очень близок к Stachybotrys и отличается от последнего только тем, что споры каждого конидиеносца окружены общей слизью. От единственного описанного для почв вида Gliobotrys alboviridis Höhnel., описываемый организм отличается по ряду признаков и является, повидимому, особым видом.

Thielavia terricola. Клейстотеции шарообразные, от 100 до 200 μ в поперечнике, в молодости бурые, при созревании — черные и жесткие, не имеющие устьица и не покрытые щетинками. Оболочка клейстотеция образована несколькими слоями с псевдопаренхиматической структурой. Сумки приблизительно в 35—40 μ. Споры эллиптические, черные, одноклетные, 6—6,5 × 9—10 μ. Выделенный вид из лишайников идентичен или очень близок с Thielavia terricola Emmons.

Chaetomium subterraneum. На среде с фильтровальной бумагой рост в виде белого пушистого мицелия с многочисленными перитециями. С обратной стороны бумага желтоватая. Молодые перитеции округлые, зрелые овальные до 300—400 μ, с прямыми, неразветвляющимися, оливково-бурыми щетинками. Базальные щетинки более тонкие, 1,5—2,0 μ и бледнее окрашенные; апикальные — 3,0—3,5 μ в поперечнике, более темные. Сумки при созревании перитеция исчезающие. Споры лимоновидные, оливково-бурые, 6,5 × 10 μ.

Chaetomium globosum. На бумаге рост в виде белого мицелия с крупными, в 500—700 μ, расположенными поодиночке или группами перитециями, темнозеленой или бурой окраски. Щетинки перитеция извилистые, но без завитков или спиралей, около 5 μ в поперечнике, с шероховатой поверхностью. Базальные и апикальные щетинки не отличаются. Сумки булавовидные, 8-споровые, при созревании перитеция рано исчезающие. Споры эллиптические, темноокрашенные, 6,0—6,5 × × 10—12,5 μ.

Chaetomium funicola. На бумаге рост в виде белой слабо пушистой грибницы. Перитеции в молодых культурах зеленые, в старых — буро-черные, овальные или эллиптические, до 300—400 μ. Щетинки буро-оливковые, базальные — прямые, неветвящиеся, 2,5—3,0 μ в поперечнике; апикальные — с короткими, иногда дихотомическими разветвлениями, 3,0—3,5 μ в поперечнике, более длинные, чем базальные. Булавовидные сумки рано исчезают. Споры бурые или оливковые, овальные или эллиптические, 4,5 × 5,0 — 6,0 μ. В старых культурах с фильтровальной бумагой жидкость окрашивалась в желтый цвет.

Chaetomium spirale. Рост на бумаге в виде белой хлопьевидной грибницы. Перитеции оливково-зеленые, овальные, до 300—400 μ. Щетинки неветвящиеся с многочисленными спиральными завитками, 3—4 μ

в поперечнике. Булавовидные сумки 35—40 μ длиной, рано исчезают. Споры лимоновидные, оливково-бурые, 5—6 × 10 — 12 μ.

VI

Открытие в лишайниковом талломе целлюлозоразрушающих грибов проливает некоторый свет на превращение органического вещества на примитивных стадиях почвообразования под литофильными лишайниками. В течение жизни лишайника отдельные его гонидии погибают и содержащаяся в их оболочках клетчатка становится добычей целлюлозоразрушающих грибов. В результате этого часть синтезированного лишайником органического вещества вовлекается в биологический круговорот. Продукты разрушения этой клетчатки вместе с соединениями, вновь синтезированными целлюлозоразрушающими грибами, дают начало гумусовым веществам, скопляющимся в лишайниковом мелкоземе. Таким образом, на поверхности горной породы накапливаются первые запасы гумуса и возникает первичная почва. Описанным, разумеется, не исчерпывается сложность превращений органических веществ литофильных лишайников. Каким образом вовлекаются в биологический круговорот другие органические соединения лишайникового таллома, остается еще неизвестным. Повидимому, в этих процессах участвует особая микрофлора, также ассоциированная с талломом лишайника.

Изложенные в настоящем сообщении материалы представляют также известный интерес для освещения вопроса о лишайнике как комплексном организме. Если с точки зрения морфологической лишайник есть двухкомпонентный симбиоз гриба и водоросли, то с экологической точки зрения лишайник представляет собой сложный микробный ценоз, в котором одни компоненты связаны симбиотическими отношениями (гриб и водоросль), а другие — метабиотическими (целлюлозоразрушающие грибы — гонидии). В микробном лишайниковом ценозе определенную роль играют и бактерии (не относящиеся к азотобактеру), о которых необходимо говорить особо.

Выводы

1. Лишайники играют большую роль в первичном накоплении органических веществ на поверхности скальных горных пород. В гумификации органических веществ лишайникового таллома принимают участие целлюлозоразрушающие грибы.

2. Из 16 видов исследованных литофильных, почвенных и эпифитных лишайников в 15 обнаружены целлюлозоразрушающие микроорганизмы.

3. Целлюлозоразрушающие микробы лишайниковых талломов представлены главным образом грибами: Chaetomium (10 образцов), Gliobotrys (9 образцов), Thielavia (5 образцов); значительно реже встречаются бактерии из рода Cellvibrio.

4. Литофильные лишайники высокогорных областей содержат, как правило, Gliobotrys и редко Chaetomium. Лишайники равнинных областей редко содержат Gliobotrys, зато в них обильно представлены целлюлозоразрушающие Chaetomium и Cellvibrio.

5. Целлюлозоразрушающие грибы расположены, повидимому, только на внешних поверхностях лишайникового таллома или в его контактной зоне, где он прикрепляется к субстрату. Во внутренних частях лишайникового таллома обитает аэробная целлюлозоразрушающая бактерия из рода Cellvibrio.

6. С экологической точки зрения лишайник является сложным микробным ценозом, в котором одни организмы связаны симбиотическими отношениями (гриб и водоросль), другие — метабиотическими (целлюлозоразрушающие микробы и гонидии).

Институт почвоведения
Академии Наук Казахской ССР
Алма-Ата

Получено 29. VI. 1949

АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУР ДЕСУЛЬФУРИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ С РАЗНЫХ ГЛУБИН ЧЕРНОГО МОРЯ

Л. К. Осницкая

Повсеместное нахождение сероводорода в глубинах Черного моря было обнаружено в 1890 г. первой глубоководной экспедицией, которая возглавлялась Андрусовым. Описывая в своей работе [1] этот удивительный факт, Андрусов предположил, что сероводород образовался в результате гниения скопляющихся на дне моря белковых веществ, а также в результате восстановления сульфатов органическим веществом.

Наличие сероводорода в Черном море было подтверждено в 1891—1892 гг. Лебединцевым [6], который изучал распределение сероводорода в глубинах моря и нашел, что с глубиной концентрация сероводорода увеличивается. Возможной причиной образования сероводорода Лебединцев считал восстановление сульфатов морской воды.

Такую же точку зрения высказал Зелинский, когда в 1893 г. в связи с вопросом о причине образования H_2S в Черном море он принял участие в экспедиции по обследованию Черного моря. Проведенные совместно с Брусиловским [3] исследования показали наличие в грунтах Черного моря бактерий, образующих сероводород. Одна из этих форм бактерий была ими выделена и названа Bacterium hydrosulfureum Ponticum. Зелинский [2] впервые поставил вопрос об участии микроорганизмов в образовании сероводорода, причем он полагал, что сероводород в Черном море образовался не из серосодержащих белковых соединений, количество которых, по его мнению, весьма незначительно на дне Черного моря, а за счет восстановления сульфатов в морской воде.

Существование в Черном море бактерий, образующих сероводород из сульфатов, было подтверждено исследованиями Исаченко [4], выделившим из илов бактерий, сходных с Microspira aestuarii.

В 1946—1948 гг. Крисс и Рукиной [5] были проведены микробиологические исследования в глубоководных областях Черного моря. Ими было установлено, что на дне моря имеется большое количество десульфурирующих микроорганизмов и микроорганизмов, разлагающих белки с образованием сероводорода, между тем как в воде на различных глубинах эти формы малочисленны. Авторы полагают, что основная масса сероводорода образуется на дне моря в результате процессов восстановления сульфатов и разложения органических остатков, протекающих примерно с одинаковой интенсивностью.

По предложению Крисс мной была исследована активность культур десульфурирующих микроорганизмов, полученных с различных водных горизонтов и со дна Черного моря. В качестве материала для исследования мне были переданы склянки с посевами воды и илов на видоизмененную среду Баарс [5], в которых о развитии десульфурирующих микроорганизмов можно было судить по образованию черного осадка или налета на стенках сернистого железа или же по наличию в белом осадке среды отдельных черных включений. Возраст культур равнялся примерно 5,5 месяца. Содержание сероводорода в этих склянках определялось следующим образом: 5—10 $см^3$, точно отмеренных, содержимого склянки переносилось в налитый в склянки с притертыми пробками

0,02 *N* раствор J_2, подкисленный HCl. Смесь выдерживалась в течение 15 минут, после чего избыток J_2, не связанный сероводородом, оттитровывался 0,02 *N* раствором $Na_2S_2O_3$ в присутствии крахмала. Расчет сероводорода производился в миллиграммах на литр. Данные сведены в таблице.

Таблица

Активность культур десульфурирующих микроорганизмов, выделенных из водной толщи и со дна Черного моря

№ станции	Глубина в м	Характеристика пробы	Было засеяно экспедицией в мл	H_2S в мг/л	H_2S в мг/л при повторном посеве через месяц
4	1	Вода	25	217,6	Не определялось
6	50	»	25	90,1	»
2	100	»	5	0,0	»
2	125	»	25	0,0	»
11	125	»	25	0,0	»
2	150	»	25	37,4	»
8	150	»	25	147,7	»
4	175	»	25	104,38	»
6	175	»	25	122,4	»
4	200	»	5	0,0	»
2	225	»	5	10,8	»
8	225	»	5	39,9	»
11	300	»	25	153	»
4	500	»	5	0,0	»
4	1 000	»	5	0,0	»
6	1 000	»	5	0,0	»
6	1 000	»	25	86,7	»
6	1 250	»	25	6,12	»
4	1 500	»	5	0,0	»
8	1 500	»	5	0,0	»
4	1 750	»	25	6,8	»
6	1 750	»	5	221	»
2	10—25	Слой планктоносферы Планктон	0,1	0,0	»
2	25—50	То же	0,1	21,8	»
11	1 900	Илы	1 см³ из развед. 1 : 10	40,8	0,0
11	1 900	»	1 см³ из развед. 1 : 100	0,0	0,0
8	2 120	»	1 см³ из развед. 1 : 10	21,9	0,0
7	2 140	»	1 см³ из развед. 1 : 10	0,0	0,0
7	2 140	»	1 см³ из развед. 1 : 100	0,0	85
7	2 140	»	1 см³ из развед. 1 : 1000	64,6	85
4	2 160	»	1 см³ из развед. 1 : 10	30,6	0,0
4	2 160	»	1 см³ из развед. 1 100	30,6	30,6

Из таблицы следует, что активность десульфурирующих микроорганизмов в глубинах Черного моря весьма различна и нельзя установить какую-либо зависимость между активностью культуры и глубиной ее нахождения. Так, для станции 4 активность десульфурирующих организмов с глубины 1 м равна 217 мг H_2S на литр, с глубины 175 м = = 104,38 мг/л, а с глубины 200 м количество образовавшегося сероводорода практически нельзя было определить, хотя и наблюдалось слабое почернение осадка в склянке. Напротив, для станции № 11 десульфурирующие микроорганизмы с глубины 125 м не образовали сероводорода, а с глубины 300 м дали 153 мг/л. Для станции № 6 активность десульфурирующих микроорганизмов с глубины 50 м равняется 90,1 мг H_2S/л, а с глубины 1250 м — 6,12 мг на литр.

Приведенный материал говорит о том, что десульфуризаторы в кислородной зоне могут обладать высокой активностью, тогда как в сероводородной зоне, где предполагались активно протекающие процессы восстановления сульфатов, сравнительно редко выделялись культуры

десульфурирующих микроорганизмов, образующих большие количества сероводорода. Следует заметить, что на глубине 150—300 м активность десульфурирующих микроорганизмов как бы достигает максимума для всех станций.

Сравнивая активность десульфурирующих бактерий из илов с активностью десульфурирующих бактерий, полученных из воды, можно сказать, что в илах процесс десульфуризации протекает с не меньшей, если не большей, интенсивностью, чем в толще воды: 1 мл из разведения 1 : 10, а иногда из разведения ила 1 : 100, 1 : 1000 давал от 22—64 мг H_2S на литр, в то время как в ряде посевов 25 мл воды образовывалась от 10 до 100 мг на литр.

Повторные посевы илов после хранения их в течение 1,5 месяца в лаборатории показали, что в части образцов активность десульфурирующих микроорганизмов сохранилась на сравнительно высоком уровне.

Выводы

1. Исследована активность культур десульфурирующих микроорганизмов, выделенных с различных глубин водной толщи со дна Черного моря.

2. Установлено, что активность выделенных культур десульфурирующих микроорганизмов весьма различна и что в сероводородной зоне, где, казалось бы, должны активно протекать процессы восстановления сульфатов, культуры десульфурирующих микроорганизмов, образующие большие количества H_2S, выделялись довольно редко, в то время как в кислородной зоне обнаружены культуры с высокой активностью.

3. Илы содержат десульфурирующие микроорганизмы, активность которых выше, чем у десульфуризаторов из толщи воды.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 28. V. 1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрусов Н. И. О сероводородном брожении в Черном море. Записки АН по физ.-мат. отдел., 1, № 1, стр. 1, 1895.
2. Зелинский Н. Д. О сероводородном брожении в Черном море и одесских лиманах. Журн. Русск. физико-хим. общ-ва, 25, 288, 1893.
3. Зелинский Н. Д. и Брусиловский Е. К. О сероводородном брожении в Черном море и одесских лиманах. Отчеты о деятельности Одесск. бальнеологич. общ-ва 1892—1893, вып. 5, стр. 47, Одесса, 1898.
4. Исаченко Б. Л. Sur la fermentation sulfhydrique dans la mer Noire. C. R. 172, No. 26, 123, 1924.
5. Криссе А. Е. и Рукина Е. А. Микробиология Черного моря. 4. О происхождении сероводорода в Черном море. Микробиология, XVIII, вып. 4, 1949.
6. Лебединцев. Предварит. отчет о химическом исследовании Черного и Азовского морей летом 1891 года. Записки Новороссийск. общ-ва естествоиспыт. 16, вып. 11, 149. Цитируется по Н. Д. Зелинскому.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЖЕЛЕЗО-МАРГАНЦЕВЫХ КОНКРЕЦИЙ

В. О. Калиненко

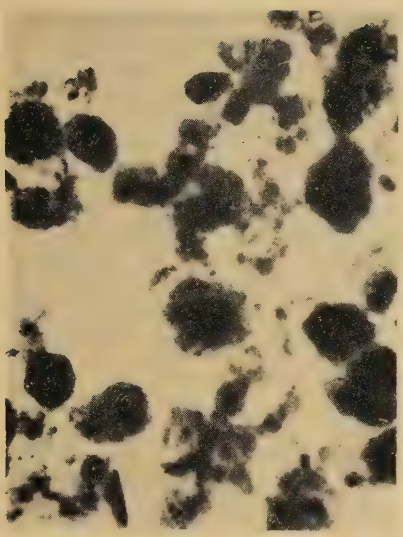
Участие бактерий, особенно железобактерий, в формировании конкреций можно исследовать двумя путями: 1) поисками их окаменелых остатков в породе и 2) экспериментальным изучением их современной осадкообразующей деятельности. Первый путь малоубедителен по той причине, что строение колониальной нити и одиночной клетки железобактерий сильно изменчиво даже в лабораторной культуре. Вместо миллиардов типичных нитей через месяц-полтора в культуре часто не остается ничего, кроме органического детрита и редких клеток. Культура, истощившая питательную среду, превращается в смесь лизированных чехлов, спор и гонидий разной величины. Трудно узнать в этих обрывках и обломках прежние палочковидные клетки, слагавшие длинные цепочки.

Если железобактерии так изменчивы на протяжении нескольких недель в лабораторных культурах, то какой морфологически достоверный материал остается от них в рудных пластах, лежащих тысячи и миллионы лет в земной коре?

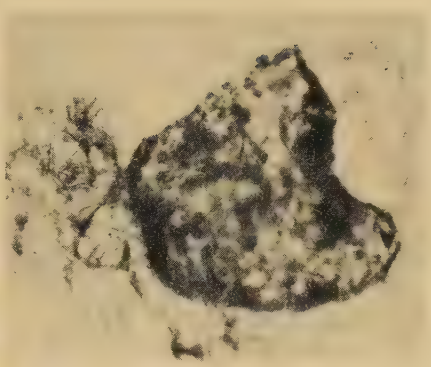
Даже в тех редких случаях, когда в шлифе видны хорошо сохранившиеся остатки бактериальных тел, можно полагать, что они попали сюда с потоком осаждающихся частиц абиогенного происхождения.

Изучение современной осадкообразующей деятельности бактерий более плодотворно, чем поиски окаменелых остатков. Первым шагом в этой работе является микроскопирование илов, в которых в наше время образуются железо-марганцевые конкреции. Микроскопирование надо сосредоточить на самых мелких конкрециях. В статье о роли бактерий в образовании железо-марганцевых конкреций в Карском море (Калиненко [4]) было показано, что микроскопия ила с поразительной ясностью открывает созидательную и формирующую роль бактерий. То же самое мы видим в илистой толще Карельских озер, где колония бактерий является прообразом плоских и округлых формирований, отвердевающих по мере того, как промежутки между телами бактерий цементируются коллоидными хлопьями железа, алюминия, марганца, кристаллическими и аморфными частицами кальция. Структурной деятельности бактерий способствует и то обстоятельство, что их колонии богаты слизью и сложены из длинных нитей, часто сбивающихся в войлок. Бактерии, особенно нитчатые, создают в грунтах плоский тканеобразный налет или округлые одиночные скопления. Заметно, что бактериальный войлок обычно образуется в местах движения воды; круглые же бактериальные формирования чаще встречаются в покойной глубине полужидкого донного ила. Но и в плоском бактериальном налете постоянно создаются очаги уплотнений в виде микроскопически малых лепешек. Видеть это можно при увеличении в 30—50 раз, беря неразрушенные железистые пленки, покрывающие гальку, песок и донный ил.

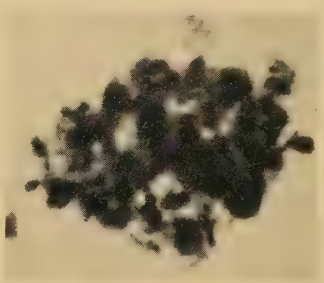
Если бы геологи микроскопировали осадки текущего дня, у них едва ли оставались бы сомнения в роли бактерий, создающих железо-марганцевые конкреции. Действительно, какие силы, кроме колониальных организмов, образующих лепешки, шары и линзы (рис. 1), могут объединить коллоидные хлопья железа и собрать в полужидком иле в единое рудное тело все то, из чего состоит конкреция?



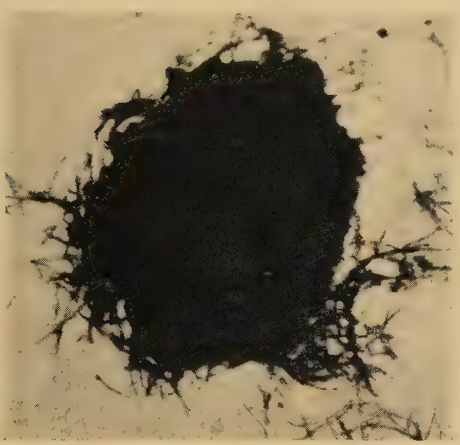
1



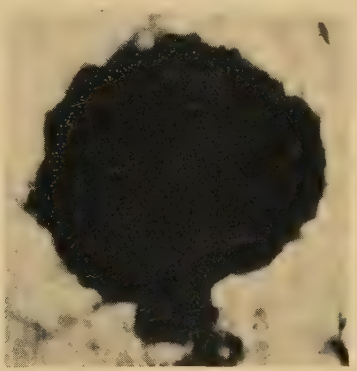
2



3



4



5

Рис. 1. Общий вид ила Пуннус-озера (Карелия) с глубины 8 м. Видны формирующиеся микроконкреции на разных стадиях; × 30

Рис. 2. Песчинка из железистого ручейка, обросшая нитями железобактерий. Темные пятна на песчинке — гидрат окиси железа, аккумулированный железобактериями; × 50

Рис. 3. Один из этапов формирования коллоидных осадков железа. Бактерии играют здесь роль фокусирующих и склеивающих агентов; × 50

Рис. 4. Формирование конкреции при помощи нитей железобактерий в лабораторных условиях; × 50.

Рис. 5. Природная микроконкреция, образованная железобактериями. Видно полное сходство с микроконкрецией, созданной в лаборатории (рис. 4); × 50

Рассматривая препараты озерных песчинок и ил, нетрудно видеть, что разные минеральные осколки обрастают бактериями (рис. 2). Тяжи из бактериальных нитей создают мостики между песчаниками и цементируют их в крупные комки. Бактерии склеивают и коллоидные хлопья. На рис. 3 изображена стадия уплотнения и собирания коллоидных частиц в сферическую форму. На всех этапах образования и отвердевания конкреции видно, что нити железобактерий создают скелеты этих губчатых формирований.

Мы микроскопировали ил на предметных стеклах в капле смеси равных частей глицерина и свежекипяченной воды (удаление газа). Частицы ила переносились в каплю и осторожно прижимались покровным стеклом. Глицерин частично просветляет биоминеральные структуры и консервирует препарат на несколько дней. В этих препаратах при разных увеличениях видны все ступени формирования сферических и плоских микроконкреций.

Увеличение размеров конкреций происходит благодаря тем наслоениям, которые создаются бактериями, обитающими на наружной поверхности конкреции. Часто в одном препарате можно найти все этапы развития конкреции. Они таковы: отдельная песчинка в своих углублениях дает приют микроскопически малой колонии железобактерий. На месте этой колонии, если она не развилась дальше, остается ржавое пятно. Одни песчинки прозрачны, другие покрыты ржавой окраской. Окрашены те песчинки, на которых обитают железобактерии. Второй этап — песчинка служит опорой для пышной нитчатой колонии. Бактерии обволакивают войлоком нитей всю песчинку, и она скрывается в этом обрастании (рис. 2). Песчинка включается внутрь будущей конкреции — явление весьма обычное. Третий этап: если окружающая вода озера снабжает питанием бактериальную колонию, прикрепившуюся к песчинке, рост железобактерий продолжается. Слой за слоем они наращивают осадки железа, марганца и остальные компоненты своей биохимической и структурно-цементирующей работы. Так возникает микроконкреция, дальнейшее укрупнение которой нетрудно видеть в материнских илах озер.

Изоляция бактерий, формирующих железо-марганцевые конкреции

Интересной работой является выделение чистых культур железобактерий, участвующих в формировании конкреций. В условиях Карельских озер эту работу нельзя считать технически трудной, если обращаться с железобактериями, во-первых, как с гетеротрофными организмами и, во-вторых, не преграждать себе путь к успеху применением жидких накопительных сред и, тем более, с закисным железом. Вместо накопительных сред лучше сосредоточить свое внимание на поисках незагрязненного материала, из микроскопической дозы которого путем размазывания по агару с пептоном можно быстро получить почти чистые колонии железобактерий-лептотриксов. Еще раз подчеркнем, что все железобактерии типично и характерно могут развиваться и без железа. Рецепт агара, на котором мы в течение одной недели выделили три вида лептотриксов-железобактерий, следующий: воды дистиллированной 1000 мл; пептона 5 г; мясного экстракта 3 г; KNO_3 1 г; агар-агара 12 г; pH равно 7,0.

Этот рецепт нельзя рассматривать как единственный и обязательный. Его можно варьировать, например, не брать мясного экстракта или ввести в агар щелочный раствор лимоннокислого железа. Поиски железобактерий мы начинали в мелких ручейках, приносящих железо в озера из торфяных болот. Ржавый ил этих ручейков зачастую содержит очень небогатое сообщество бактериальных видов. Очень быстро можно изолировать нитчатую железобактерию из этого сообщества, если брать све-

жие нити из донного налета и не делать густых посевов на чашках. Многие лептотриксы спороносны. Это обстоятельство, возможно, облегчит их отделение от спутников путем прогревания посевного материала. Мы этот прием не применяли, так как почти из первых же чашек получали искомых лептотриксов-железобактерий, поступая так: отыскивали мелкий и медленно текущий ручеек, дно которого обычно устлано ржавым слизистым налетом. Микроскопируя налет на месте при помощи 20-кратной лупы на предметном стекле, мы убеждались в изобилии нитчатых железобактерий. Собирали свежие налеты, не разрушая их структуры, и как можно быстрее в лаборатории делали в нескольких чашках серию посевов растиранием по вышеописанному агару. Нитчатые железобактерии вырастают в виде звездчатых колоний или в виде нитчатых клубков. Вырезая колонию из агара, мы растирали ее стеклянным шпателем по поверхности агара, предварительно подсушенного в сушильном шкафу 20 минут при 60°.[1] Чистую культуру из колонии на чашке мы перевивали на слабощелочную 1,5% пептонную воду с 0,01% лимоннокислого железа. В этой среде лептотриксы-железобактерии показывают способность аккумулировать железо в своих чехлах или осаждать его из питательного раствора в форме осадков разного вида.

Кроме ручейков, впадающих в озеро, мы искали железобактерий в донных осадках озера.

В иле Карельских озер возникают и растут шаровидные и плоские железо-марганцевые конкреции. В поисках бактерий, формирующих эти рудные тела, мы применяли те же приемы, что и с илом Карского моря [4]. В микроконкрециях Карельских озер, погруженных в остывающий агар (42°), рост бактерий обозначался в виде ореола вокруг сферического тела конкреции. Удавалось видеть, как бактерии, вырастая изнутри микроконкреции, раздвигали своей массой еще не уплотнившееся губчатое тело конкреции.

Краткое описание двух видов лептотриксов, формирующих конкреции

Неправильно думать, что железо-марганцевые конкреции создаются в природе одним каким-нибудь видом бактерий.

На конкрециях Карского моря было видно, что их могут формировать не только нитчатые железобактерии. Вероятно, кроме Bact. precipitatum Kalin., в Карском море существуют другие бактериальные виды или сообщества видов, способные образовывать осадки железа и марганца и склеивать их.

Из нескольких видов нитчатых бактерий, образующих конкреции в Карельских озерах, мы кратко характеризуем только два вида: Leptothrix Punni и Leptothrix Wernadskyi. Полное их описание будет дано в другой работе.

В таблице приведены значения pH, создаваемые двумя лептотриксами после пятисуточного роста. Здесь же показано отношение их к крахмалу и желатине; L. Punni и L. Wernadskyi спороносны. Споры их убиваются при 90° через 15 минут. Оба вида бактерий грамположительны.

Даже краткая биохимическая характеристика двух видов карельских железобактерий показывает присутствие у них ферментативного аппарата гетеротрофных бактерий. В нашей коллекции они уже второй год отлично перевиваются на пептонном бульоне с лимоннокислым аммиачным железом.

Заставить бактерий создать конкрецию в лабораторных условиях довольно просто. Чистые культуры железобактерий на жидких средах об-

[1] Отсутствие излишка конденсационной воды на агаре облегчает изоляцию колоний и освобождение от спутников.

Таблица

Биохимическая характеристика лептотриксов, формирующих конкреции в Карельских озерах

Название бактерии	Колбы	Глюкоза	Сахароза	Лактоза	Маннит	Крахмал	Желатина
Leptothrix Punni	Контрольные	7,06	7,80	7,33	7,58	—	—
	Засеянные	5,08	7,11	7,51	7,69	Разжижает энергично	Разжижает послойно
Leptothrix Wernadskyi	Контрольные	7,16	7,31	6,93	7,24	—	—
	Засеянные	4,76	5,79	6,18	4,82	Разжижает слабо	Разжижает послойно

разуют узлы из сплетенных нитей. Даже невооруженным глазом можно отыскать эти места в бактериальном войлоке, лежащем на дне сосуда или плавающем в питательной среде. Эти сгустки-фокусы, обогащенные осадками железа, образуют в колбах сферические или плоские конкреции (рис. 4). Таким образом, в лаборатории в течение нескольких недель на водопроводной воде, несколько обогащенной азотом, органическим веществом, фосфором и железом, чистые культуры железобактерий формируют типичную микроконкрецию, не отличающуюся от природной ни формой, ни размерами (рис. 4 и 5).

Разумеется, минеральный состав природной конкреции отличен от конкреции, созданной в лаборатории, потому что в колбах мы не воспроизводим сезонных химических изменений и прилипания микроскопической взвеси к слизи колоний, имеющих место в сапропелевых грунтах. При лабораторно-экспериментальном формировании конкреций мы заставляем бактерий создать скелет рудного тела, который они наполняют и одевают железом, марганцем, кальцием и органическими компонентами своих трупов. В природе те же бактерии формируют конкреции более сложного минерального состава, отображающего большее разнообразие условий, сопровождающих их созидательную работу.

В образцах грунта, поднятых батометром, бросается в глаза обилие железо-марганцевых конкреций разной формы. Не менее половины каждой донной пробы составляют сферические или плоские конкреции, задерживающиеся на сите. Очевидно, сапропелевые грунты Карельских озер настолько богаты бактериогенными железо-марганцевыми формированиями, что рудоискатели могли бы здесь начать эксплоатацию железной руды.

Мы можем отметить и другой факт: очень высокую скорость образования конкреций. На многих предметах, утонувших в озере в период войны 1939—1940 гг., были найдены многочисленные железистые натеки размером до 5 см. Таким образом за 8—9 лет в озере образовались крупные железистые конкреции. Это явление дает уверенность, что озера, очищенные в промышленной эксплоатации от залежей железа, через несколько лет снова заполнятся сферическими и плоскими железо-марганцевыми конкрециями. Несомненно, бурение и магнитная разведка откроют в древних уровнях дна Карельских озер под пластами современного ила залежи биогенного железа.

Выводы

1. При микроскопировании препаратов и капель с ненарушенной естественной структурой ила видны все стадии формирования железо-

марганцевых конкреций. Первичные конкреции имеют микроскопические размеры, обычно игнорируемые геологами; они начинают замечать конкрецию, выросшую до размеров просяного зерна.

2. Формирующая деятельность бактерий видна на стадиях, предшествующих размерам просяного зерна. Бактерии создают конкрецию путем собирания единичных коллоидных хлопьев и цементирования промежутков прочным войлоком своих нитей, импрегнированных кремнием, марганцем, железом и кальцием.

3. Бактерии придают этим биоминеральным комплексам сферическую или лепешкообразную форму, столь характерную для бактериальных колоний.

4. Чаще всего железо-марганцевые рудные тела в Карельских озерах создаются нитчатыми железобактериями из рода Leptothrix.

5. Изоляция этих железобактерий очень легко достигается на чашках с пептонным агаром. Присутствие или отсутствие железа при этом не существенно, так как развитие нитчатых железобактерий определяется органическим питанием.

6. В лабораторных условиях эти чистые культуры нитчатых железобактерий, изолированных из Карельских озер, в течение нескольких недель формируют микроконкреции, совершенно сходные с природными.

7. Наблюдениями в природе установлено, что за 8—9 лет в озерах вырастают железо-марганцевые конкреции размерами с голубиное яйцо. На этом основании, вероятно, возможна промышленная эксплоатация биогенного железа.

Институт океанологии
Академии Наук СССР

Получено 19. III. 1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Буткевич В. С. Образование морских железо-марганцевых отложений и участвующие в нем микроорганизмы. Тр. Морского научн. инст., III, вып. 3, 1928.
2. Едемский М. Б. Озерные руды Олонецкого края. Природа, № 10, 1916.
3. Исаченко Б. Л. Микробиологическая характеристика грунтов и воды Карского моря. Тр. Арктич. инст., 82, 1937.
4. Калиненко В. О. Роль бактерий в формировании железо-марганцевых конкреций. Микробиология, XV, № 5, 1946.
5. Перфильев Б. В. Новые данные о роли микроорганизмов в рудообразовании Изв. Геологич. комитета, 45, № 7, 1926.

ОБ УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММОВ ПЕНИЦИЛЛОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ

Т. П. Сизова

Вопрос о том, как сохранить по возможности в неизменном виде коллекционные культуры штаммов рода Penicillium, представляет несомненный научный и практический интерес. Для выяснения этого вопроса прежде всего необходимо проследить, каким изменениям подвергаются в культуре представители этого рода. Что изменения эти, большей частью дегенеративного порядка, наблюдаются у ряда штаммов через некоторое время культуры, хорошо известно всем, кто имел дело с коллекциями этих грибов [2]. Особенно это может быть отмечено в отношении культуральных признаков (окраска верхней и нижней поверхности колонии, ее общее сложение и т. д.), меняющихся зачастую от посева к посеву, при довольно устойчивом и однообразном морфологическом строении представителей различных секций. В то же время эти признаки отнесены (повидимому, без достаточных оснований) к признакам видовым, что чрезвычайно затрудняет определение и разграничение видов. Однако в литературе чрезвычайно скудны указания на то, какие признаки наиболее подвержены изменениям, какие сроки содержания в культуре вызывают изменение признака, одинаково ли протекает в различных секциях рода Penicillium процесс изменения в результате длительного культивирования и т. д. В наиболее крупной по этому вопросу монографии рода Penicillium Thom [5] мы находим лишь несколько замечаний встречающихся в отдельных местах. Thom начал коллекционировать пенициллы с 1904 г. За 25 лет содержания в культуре (в каких условиях и на каких средах — не указано) некоторые штаммы (Penicillium camemberti Thom No 5, подсекция Lanata-typica, Penicillium roqueforti Thom No 18, подсекция Asymmetrica-velutina и Penicillium citrinum Sopp No 15, подсекция Asymmetrica velutina) оказались неизмененными. Другие же дегенерировали после существования в коллекции в течение 10—12 лет. Некоторые штаммы, как, например, Penicillium avellaneum Thom et Tur. № 4010. 7 секции Biverticillata symmetrica, утратили способность вырабатывать аскоспоры, что Thom объясняет наличием в первоначальной культуре обоих конъюгирующих гаплонтов и утратой одного из них в течение ряда перевивок. У некоторых штаммов секции Biverticillata symmetrica (как, например, Penicillium purpurogenum var. rubrisclerotium Thom № 2670) через несколько лет культуры исчезли склероции. Thom приходит к выводу, что сохранение культур в течение длительного периода времени без утраты черт, типичных для вида, едва ли возможно или во всяком случае сомнительно.

Мы проследили на материалах нашей коллекции некоторые изменения морфологического порядка на довольно значительном количестве штаммов. Всего было проверено 109 штаммов Penicillium, относящихся к 47 видам, причем одни из них были переопределены через год культивирования на агаризированной среде Чапека (в пробирках) при комнатной температуре, а другие через 3 года (перевивки коллекционных штаммов обычно производились один раз в полгода). Грибы из пробирок с агаризированной средой Чапека высевались в чашки Петри с той же средой (каждый штамм высевался в отдельную чашку). Посевы производились отдельными уколами без возобновления споровой нагрузки

таким образом, что на поверхности питательной среды развивалось 5—6 колоний, находящихся на значительном расстоянии друг от друга. Чашки помещались в термостат при 27° и после недели роста произво-

Таблица 1

I. Секция Monoverticillata stricta

№ п/п.	Название вида	Время пребывания в культуре в годах	
1	Penicillium Adametzii Zal. штамм № 4/2	1	Изменений не наблюдалось
	Penicillium Adametzii Zal. штамм № 4/3	1	
2	Penicillium baiiolum Biourge штамм № 9/1	3	
3	Penicillium decumbens Thom штамм № 112	3	
4	Penicillium fellutanum Biourge штамм № 1/1	1	
5	Penicillium flavi-dorsum Biourge штамм № 141	3	
6	Penicillium implicatum Biourge штамм № 8/1	1	
	Penicillium implicatum Biourge штамм № 8/2	1	
7	Penicillium multicolor Grig.-Man. штамм № 138/1	3	
8	Penicillium pfefferianum Wehm. штамм № 40/1	1	Колонии пестрые (чередующиеся зеленые и белые клинья); оранжевая окраска нижней поверхности
	Penicillium pfefferianum Wehm. штамм № 132	3	Полная дегенерация. Бледнорозовая окраска колоний, отсутствуют конидиеносцы
9	Penicillium restrictum Gilb. et Abb. штамм № 15/1	1	Задержка в появлении конидиального спороношения (появляется примерно через 2 недели после посева)
	Penicillium restrictum Gilb. et Abb. штамм № 61	1	Изменений не наблюдалось
	Penicillium restrictum Gilb. et Abb. штамм № 75	1	То же
	Penicillium restrictum Gilb. et Abb. штамм № 156/1	1	Задержка в появлении конидиального спороношения
	Penicillium restrictum Gilb. et Abb. штамм № 157/1	1	То же
10	Penicillium roseo-purpureum Dier. штамм № 19/1	3	Изменений не наблюдалось
11	Penicillium spinulosum Thom штамм № 55/1	1	То же
12	Penicillium subcinereum Westl. штамм № 2/1	3	Полная дегенерация. Колонии чисто белые; конидиеносцы отсутствуют
13	Penicillium thomii Maire штамм № 75	3	Исчезли склероции
	Penicillium thomii Maire штамм № 155/1	3	» »
14	Penicillium Trzebinskii Zal. штамм № 5/1	1	Изменений не наблюдалоеь

дилось первое определение штаммов (так, будто о них ничего не было известно раньше). Если сразу получалось совпадение с тем определением, которое было произведено перед помещением их в коллекцию,— работа на этом заканчивалась. В противном случае определение растягивалось еще на одну-две недели. В процессе такого переопределения штаммов коллекции отмечались те изменения, которые произошли с ними.

Какие же изменения морфологических свойств произошли в результате сравнительно недолгого периода культивирования штаммов? Это показывают приведенные в тексте таблицы.

По изменениям в отдельных секциях на основании приведенных данных можно сделать следующие заключения:

I. Секция Monoverticillata-stricta

Из просмотренных 13 видов (21 штамм) изменения обнаружены у 3 (т. е. у 23%) видов (7 штаммов). У обоих исследованных штаммов вида Penicillium thomii Maire исчезли полностью склероции. Это произошло уже после года культивирования. В диагнозе этого вида Thom [5] отме-

Таблица 2

II. Секция Monoverticillata ramigena

№ п/п.	Название вида.	Время пребывания в культуре в годах	
1	Penicillium breve Bain et Sart. штамм № 88	1	
2	Penicillium cyaneum Biourge штамм № 45/1	1	
3	Penicillium minutum Bain. штамм № 13/1	3	Изменений не наблюдалось
	Penicillium minutum Bain. штамм № 119	3	
	Penicillium minutum Bain штамм № 120	3	
4	Penicillium ramosum Bain. et Sart. штамм № 23	3	Задержка появления конидиального спороношения (появление через 2 недели после посева)
	Penicillium ramosum Bain. et Sart. штамм № 43	3	
	Penicillium ramosum Bain. et Sart. штамм № 53	3	
	Penicillium ramosum Bain. et Sart. штамм № 69	3	Изменений не наблюдалось
	Penicillium ramosum Bain. et Sart. штамм № 81	3	
	Penicillium ramosum Bain. et Sart. штамм № 82	3	
	Penicillium ramosum Bain. et Sart. штамм № 84	3	
	Penicillium ramosum Bain. et Sart. штамм № 107	3	
	Penicillium ramosum Bain. et Sart. штамм № 108	3	
	Penicillium ramosum Bain. et Sart. штамм № 110	3	
5	Penicillium Sartoryi Thom. штамм № 38/1	1	
6	Penicillium Siemaszkii Zal. штамм № 86	3	
	Penicillium Siemaszkii Zal. штамм № 223	3	

Таблица 3

III. Секция Asymmetrica

№ п/п.	Название вида	Время пребывания в культуре в годах	
	А. Подсекция Velutina		
1	Penicillium asperulum Bain. штамм № 12	3	
	Penicillium asperulum Bain. штамм № 13	3	
2	Penicillium casei Staub штамм № 14	3	
	Penicillium casei Staub штамм № 38	3	
	Penicillium casei Staub штамм № 55	3	
	Penicillium casei Staub штамм № 56	3	
3	Penicillium chrysogenum Thom. штамм № 91	3	
	Penicillium chrysogenum Thom. штамм № 117/1	1	
	Penicillium chrysogenum Thom. штамм № 167/1	1	
4	Penicillium citreo-roseum Dier. штамм № 3/1	1	
	Penicillium citreo-roseum Dier. штамм № 70	3	
5	Penicillium cyaneo-fulvum Biourge штамм № 12/1	1	
6	Penicillium griseo-roseum Dier. штамм № 18/1	1	
	Penicillium griseo-roseum Dier. штамм № 49	3	Изменений не наблюдалось
7	Penicillium Melinii Thom. штамм № 14/1	1	
8	Penicillium notatum Westl. штамм № 89/1	1	
9	Penicillium puberulum Bain. штамм № 9	3	
	Penicillium puberulum Bain. штамм № 16	3	
	Penicillium puberulum Bain. штамм № 16/1	1	
	Penicillium puberulum Bain. штамм № 17	3	
	Penicillium puberulum Bain. штамм № 30	3	
	Penicillium puberulum Bain. штамм № 93	3	
	Penicillium puberulum Bain. штамм № 98/1	1	
	Penicillium puberulum Bain. штамм № 100	3	
	Penicillium puberulum Bain. штамм № 101	3	
	Penicillium puberulum Bain. штамм № 137/1	1	
10	Penicillium vesiculosum Bain. штамм № 67	3	

Таблица 3 (продолжение)

№ п/п.	Название вида	Время пребывания в культуре в годах	
	Penicillium vesiculosum Bain. штамм № 161/1	1	
11	Penicillium Westlingii Zal. штамм № 10/1	1	
	Penicillium Westlingii Zal. штамм № 109	3	
	Penicillium Westlingii Zal. штамм № 135	3	
	Б. Подсекция Lanata-typica		
1	Penicillium camemberti Thom. штамм № 99/1	1	
2	Penicillium commune Thom. штамм № 24/1	1	
	Penicillium commune Thom. штамм № 128/1	3	
3	Penicillium fusco-glaucum Biourge штамм № 97/1	1	
	Penicillium fusco-glaucum Biourge штамм № 130/1	3	
	Penicillium fusco-glaucum Biourge штамм № 132	3	
4	Penicillium lanosum Westl. штамм № 17/1	1	
	Penicillium lanosum Westl. штамм № 75/1	1	
	Penicillium lanosum Westl. штамм № 187	3	
	Penicillium lanosum Westl. штамм № 209	3	Изменений не наблюдалось
	В. Подсекция Lanata-divaricata		
1	Penicillium glauco-griseum Sopp. штамм № 6/1	1	
	Penicillium glauco-griseum Sopp. штамм № 52	3	
2	Penicillium Janczewskii Zal. штамм № 7/1	1	
3	Penicillium Jenseni Zal. штамм № 25/1	1	
4	Penicillium Kapustinskii Zal. штамм № 89	3	
5	Penicillium nigricans Bain. штамм № 44	3	
	Penicillium nigricans Bain. штамм № 51	3	
	Penicillium nigricans Bain. штамм № 73/6	1	
	Penicillium nigricans Bain. штамм № 113	3	
	Penicillium nigricans Bain. штамм № 170	3	
	Г. Подсекция Funiculosa		
1	Penicillium flavo-glaucum Biourge штамм № 31/1	1	

Таблица 3 (продолжение)

№ п/п.	Название вида	Время пребывания в культуре в годах	
	Д. Подсекция Fasciculata		
1	Penicillium corymbiferum Westl. штамм № 31	3	Изменений не наблюдалось
	Penicillium corymbiferum Westl. штамм № 39	3	
	Penicillium corymbiferum Westl. штамм № 45	3	
	Penicillium corymbiferum Westl. штамм № 46	3	
	Penicillium corymbiferum Westl. штамм № 50	3	
	Penicillium corymbiferum Westl. штамм № 87	3	

Таблица 4

IV. Секция Biverticillata-symmetrica

№ п/п.	Название вида	Время пребывания в культуре в годах	
1	Penicillium herquei Bain. et Sart. штамм № 29/1	1	Исчезла желтая окраска колоний
2	Penicillium luteum Sopp штамм № 129/1	3	Окраска обратной стороны колоний бесцветная, вместо красной в первоначальной культуре
3	Penicillium luteum Zuc. штамм № 7	3	Клейстокарпии исчезли
	Penicillium luteum Zuc. штамм № 71	3	Не изменился. Клейстокарпии сохранились, но зрелые споры в них не обнаружены
	Penicillium luteum Zuc. штамм № 116	3	То же
	Penicillium luteum Zuc. штамм № 160	1	Клейстокарпии исчезли
4	Penicillium rugulosum Thom штамм № 27/1	1	Изменений не наблюдалось
5	Penicillium sulfureum Sopp штамм № 20/1	1	
	Penicillium sulfureum Sopp штамм № 20/2	1	
	Penicillium sulfureum Sopp штамм № 20/3	1	

чает в монографии, что в культуре при частых перевивках этот вид может быть вообще утрачен [1].

Там же приводится интересный факт, как штамм, полученный Thom от Levis, сначала обильно производил склероции, затем утратил эту способность. Как следует из наших наблюдений на двух штаммах, исчезновение склероциев происходит через сравнительно непродолжительное время.

[1] См. [5], стр. 174.

Интересны изменения, происшедшие у штаммов Penicillium pfefferianum Wehm. После года пребывания в культуре штамм Penicillium pfefferianum № 40/1 давал пестрые колонии (чередующиеся зеленые и белые клинья) с оранжевой окраской нижней поверхности. Штамм № 132, пробывший в условиях культуры в течение трех лет, обнаружил полную дегенерацию. Цвет колоний был бледнорозовый, сами колонии пушистые (даже какие-то «щетинистые»). При просмотре колоний на месте роста (при малом увеличении микроскопа) совершенно не удалось обнаружить конидиеносцев. Это подтвердилось при просматривании микроскопических препаратов. Зато в поле зрения было большое количество бесцветных образований различных размеров, кажущихся частями распавшихся гиф или конидиеносцев.

У 3 из 5 штаммов Penicillium restrictum Gilb et. Abb. (№№ 15/1, 156/1 и 157/1) через год после начала культивирования наблюдалась задержка образования конидиального спороношения (появление его только через две недели после посева).

К сказанному следует еще добавить, что у исследованного нами Penicillium multicolor Grig.-Man. (№ 138/1) никаких изменений после трех лет существования в культуре не произошло, тогда как Thom отмечает, что в нескольких, правда, случаях гриб был в культуре утрачен. В частности, Thom указывает на исчезновение характерного для этого вида пигментообразования [2]. К сожалению, здесь у Thom отсутствует указание срока пребывания в культуре, после истечения которого штамм изменился.

II. Секция Monoverticillata-ramigena

Среди 6 проверенных видов (18 штаммов) этой секции только один — Penicillium ramosum Bain. et Sart.— оказался слегка измененным культурой штаммы №№ 23, 43, 53). Изменения выражались в задержке появлений конидиального спороношения, в связи с чем колонии имели белую окраску и отличались вместе с тем хорошим ростом. Конидии появились у этих штаммов после двух недель роста. Надо заметить, что такого рода изменения произошли после трех лет пребывания в культуре и были свойственны лишь трем штаммам вида Penicillium ramosum из 10 проверенных штаммов данного вида, так что практически можно считать этот вид мало подверженным изменениям (как и другие проверенные виды секции Monoverticillata-ramigena).

III. Секция Asymmetrica

Из 22 исследованных видов (59 штаммов) этой секции, к которой принадлежит большинство видов Penicillium, ни один не изменил сколько-нибудь значительно своих характерных черт. Общее сложение колоний, конидиеносцы, обилие образования конидий, пигментообразование, эксудат, запах стойко удерживаются представителями данной секции. Единственно, что может быть отмечено,— это несколько более скудный рост и некоторое снижение продукции конидий (соответственно менее яркая, менее интенсивная окраска колоний) у Penicillium glauco-griseum Sopp. № 52 после трех лет культуры Штамм № 6/1 этого же вида после года пребывания в коллекции не обнаружил никаких изменений. Те самые штаммы из коллекции Thom, о которых говорилось выше, что они не изменились после 25 лет пребывания в культуре, относятся к этой же секции — Asymmetrica.

В диагнозах, данных Thom, встречается несколько небезынтересных замечаний относительно сохранения жизнеспособности конидий у видов этой секции. Так, в диагнозе Penicillium chrysogenum Thom отмечается, что в одной пробирочной культуре конидии сохраняли свою жизнеспо-

---

[2] См. [5], стр. 213.

собность в течение 8 лет [3]. Точно так же в диагнозе Penicillium glaucogriseum Sopp. указывается, что конидии этого вида сохраняли способность к прорастанию три года.

IV. Секция Biverticillata-symmetrica

Из наблюдений, произведенных над 5 видами (10 штаммами) данной секции, особенно интересны те, которые касаются штаммов вида Penicillium luteum Zuc. В диагнозе этого вида отмечается наличие клейстокарпиев с аскоспорами (размерами 4,8 × 3,3μ с тремя поперечными ребрами). Мы располагали 4 штаммами этого вида. Два штамма (№№ 7 и 160/1) полностью утратили клейстокарпии (штамм № 160/1 — после года, а штамм № 7 после трех лет культивирования). У штамма № 160/1 после двух недель роста закладывались, правда небольшие, желтые клубочки, образованные сплетением гиф, но дальше они не развивались. Два других штамма — №№ 71 и 116 — после пребывания в культуре в течение трех лет отличались прекрасным ростом и образовали клейстокарпии. Однако в последних не были обнаружены зрелые споры, что объясняется, быть может, недостаточным для их окончательного созревания сроком существования данных колоний.

Изменения Penicillium luteum Sopp (штамм № 129/1) выразились только в изменении окраски нижней части (в диагнозе и в первоначальной культуре она красная или бледномясная, а по прошествии трех лет культуры бесцветны).

В числе диагностических признаков Penicillium culfureum Sopp указывается возможное развитие (на агаризированной среде Чапека) клейстокарпиев или склероциев. У трех наших штаммов (№№ 20/1, 20/2 и 20/3) ни в начальной культуре, ни в последующих отвивках склероциев и клейстокарпиев не было.

И, наконец, у Penicillium herquei Bain et Sart. (29/1) после года культивирования исчезла желтая окраска колоний.

Кроме этих видов Penicillium, размещающихся в данных секциях, мы имели еще Penicillium fieberi Corda (отнесенный Thom в раздел undeterminable Penicillia). После трех лет культивирования окраска колоний этого штамма несколько «поблекла» (тон колоний стал скорее сероватый или буроватый), но гриб рос хорошо и обильно давал конидии.

В добавление к вышеизложенному можно привести некоторые данные по роду Aspergillus (принадлежащему к тому же семейству Aspergillaceae, что и род Penicillium). Относительно представителей этого рода Thom [4] замечает, что при содержании их в благоприятных условиях они сохраняют свои морфологические признаки и свои физиологические реакции в течение многих поколений [4]. Многие штаммы из коллекции Thom, видимо, сохранялись без изменений в течение 10—12 лет культивирования.

Aspergillus oryzae у McCrea сохранял свою жизнеспособность (в пробирочной культуре) в течение 22 лет.

Currie 10 лет культивировал Aspergillus niger, причем его способность образовывать лимонную кислоту не изменилась.

В лаборатории Wehmer Aspergillus flavus оставался вполне жизнеспособным после 9 лет содержания в культуре.

Нами (точно таким же способом, как и при исследовании штаммов Penicillium) было проверено 15 видов (30 штаммов Aspergillus). Табл. 5 дает представление о состоянии этих штаммов.

Следовательно, изменения после года пребывания в культуре наблюдались у трех видов аспергиллов.

Aspergillus flavus Link — штамм № 5/1 — утратил имевшиеся у него склероции. Это же случилось с клейстокарпиями у Aspergillus nidulans

[3] См. [5], стр. 262.
[4] См. [4], стр. 25.

Eidam (штаммы №№ 3/2, 3/3, 3, 4). Только у одного штамма из 4 (№ 3/5) клейстокарпии не исчезли. В то же время Aspergillus auricoma

Таблица 5

№ п/п.	Название вида	Время пребывания в культуре в годах	
1	Aspergillus auricoma Guègnem штамм № 8/1	1	
2	Aspergillus candidus Link штамм № 14/1	1	Изменений не наблюдалось
	Aspergillus candidus Link штамм № 173	3	
3	Aspergillus flavipes Bain. et Sart. штамм № 13/1	1	
4	Aspergillus flavus Link. штамм № 5/1	1	Исчезли склероции
	Aspergillus flavus Link. штамм № 180	3	
5	Aspergillus fumigatus Fres. штамм № 9/1	1	
	Aspergillus fumigatus Fres. штамм № 195	3	Изменений не наблюдалось
	Aspergillus fumigatus Fres. штамм № 197	3	
	Aspergillus fumigatus Fres. штамм № 200	3	
6	Aspergillus nidulans Eidam. штамм № 3/2	1	
	Aspergillus nidulans Eidam. штамм № 3/3	1	Исчезли клейстокарпии
	Aspergillus nidulans Eidam штамм № 3/4	1	
	Aspergillus nidulans Eidam. штамм № 3/5	1	
7	Aspergillus niger v. Thiegh. штамм № 19/1	3	
	Aspergillus niger v. Thiegh. штамм № 36	3	
	Aspergillus niger v. Thiegh. штамм № 103	3	
	Aspergillus niger v. Thiegh. штамм № 139	3	Изменений не наблюдалось
	Aspergillus niger v. Thiegh. штамм № 254	3	
8	Aspergillus ochraceus Wilh. штамм № 7/1	1	
	Aspergillus ochraceus Wilh. штамм № 20/1	1	
	Aspergillus ochraceus Wilh. штамм № 32	3	Рост скудный, бледная окраска, задержка образования конидий
9	Aspergillus repens Sacc. штамм № 11/1	1	
10	Aspergillus Sydowi Bain. et Sart. штамм № 15/1	1	
11	Aspergillus terreus Thom штамм № 1/2	1	
12	Aspergillus Tiraboschii Carb. штамм № 16/1	1	
13	Aspergillus ustus Bain. штамм № 2/1	1	Изменений не наблюдалось
14	Aspergillus versicolor Tirab. штамм № 17/1	1	
	Aspergillus versicolor Tirab. штамм № 228	3	
15	Aspergillus Wentii Wehm. штамм № 10/1	1	

Guégnem (№ 8/1) сохранил полностью свою способность к образованию склероциев, а Aspergillus repens Sacc.— к образованию клейстокарпиев.

Aspergillus ochraceus Wilh. (№ 32) после трех лет культуры имел скудный рост, колонии отличались бледной окраской, имели щетинистый вид. Образование конидий задерживалось (наступало примерно через две недели после посева и не было обильно).

Интересно отметить, что из перечисленных видов в диагнозах у 7 (Aspergillus auricoma, Aspergillus candidus, Aspergillus flavipes, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus ochraceus и Aspergillus Wentii) описаны склероции, а двух (Aspergillus nidulans и Aspergillus repens) — клейстокарпии. В диагнозах наших исходных штаммов (перед помещением их в коллекцию) склероции указывались у двух видов (Aspergillus auricoma и Aspergillus flavus) и клейстокарпии также у двух (Aspergillus nidulans и Aspergillus repens). Как видно из приведенного материала, исчезновение клейстокарпиев или склероциев имеет место и в пределах этого рода и может быть объяснено таким же образом, как и для представителей рода Penicillium.

Вот все те немногие, далеко не полные и охватывающие сравнительно небольшое число видов и штаммов наблюдения, которые были нами произведены. Эти наблюдения совершенно не затрагивали таких весьма важных свойств, как антибиотическая активность, как другие физиологические свойства штаммов пенициллов и аспергиллов, изменения которых в результате некоторого времени культивирования было бы чрезвычайно важно проследить (что нам было невозможно сделать по условиям работы).

Как можно заметить из представленного небольшого материала, наиболее подверженными изменениями среди представителей рода Penicillium оказались представители секций Monoverticillata stricta и Biverticillata symmetrica, т. е. виды, обладающие сравнительно простым строением конидиального аппарата. Среди них чаще, чем в других группах, встречаются виды, имеющие клейстокарпии или склероции; из последних у некоторых развиваются также клейстокарпии, так что склероций оказывается нередко лишь более ранней стадией развития плодового тела. При этом наиболее бросается в глаза исчезновение клейстокарпиев или склероциев, наличие или отсутствие которых играет важную роль при определении. Приходится согласиться с объяснением этого явления, которое дает Thom, предполагая потерю одного из гаплонтов при последовательных перевивках. Действительно, гетероталлизм, с несомненностью установлен у ряда грибов из этих родов, например для Penicillium luteum. Самая редкость сумчатых спороношений у представителей рода Aspergillus и особенно у Penicillium может быть объяснена гетероталлизмом и тем, что разные полы неодинаково распространены в природе. У некоторых форм один пол, вероятно, совсем утратился (или сделался крайне редким), тогда получается настоящий несовершенный гриб [1]. Отсюда понятна важность сохранения и развития конидиального спороношения, что особенно выражено в секции Asymmetrica.

Исчезновение клейстокарпиев может происходить, таким образом, довольно быстро и часто зависит от частоты и способа пересева культуры. Можно привести еще один факт, имевший место в 1945 г. с одним из наших штаммов Penicillium, выделенным из подмосковной лесной почвы. Первоначально колонии этого штамма имели огромное количество белых клейстокарпиев, покрытых сверкающими каплями жидкости и занимавших весь центр колонии, вокруг которого затем появлялся нежноголубой венчик конидиальной зоны, а за ней шла зона бесцветная, с меньшим развитием конидиеносцев. Конидиеносцы были асимметрического типа. Определить вид этого Penicillium не удалось. После нескольких месяцев культивирования (и двух перевивок) клейстокарпии полностью исчезли. Колонии приобрели чисто белую окраску. В это время гриб был

определен как Penicillium caseicolum Bain (Lanata typica). Среди синонимов этого вида, указанных при диагнозе в монографии Thom [5], имеется Penicillium candidum Roger and Maze not Link (!).

Далее в диагнозе расшифровывается это замечание следующим образом: оказывается, Maze считал этот вид тождественным с Penicillium candidum Link, но Thom полагает, что это неправильно, так как в работе Morini [3] для Penicillium candidum Link указана аскогенная стадия, которая никогда не возникала у Penicillium caseicolum Bain в течение ряда лет культивирования. Здесь Thom проявляет известного рода непоследовательность в рассуждениях, так как, основываясь на других его же замечаниях, можно сделать вывод, что эта стадия была, но утратилась, и что Maze прав, считая синонимами Penicillium caseicolum Bain и Penicillium candidum Link., что собственно нашло подтверждение в приведенном выше факте исчезновения клейстокарпиев у нашего штамма.

Чрезвычайно интересна стойкость, которую проявляют в культуре представители секции Asymmetrica, обладающие большой частью (или почти исключительно) сложно построенными, мощно развитыми и дающими большую продукцию конидиеносцами. Конечно, это свойство с необходимостью связывается и с тем, насколько шире и полнее, чем другие, представлены виды именно этой секции в почвах различного происхождения и типа.

Об этом могут дать представление следующие данные.

Таблица 6

Авторы	Общее число видов	Monoverticillata stricta		Monoverticillata ramigena		Asymmetrica		Biverticillata symmetrica		
		количество видов	%	количество видов	%	количество видов	%	количество видов	%	
Thom [5]	386*	94	24	11	3	210	55	71	18	Данные лаборатории низших растений МГУ
Кочеткова	60**	19	31,6	6	10	28	46,8	7	11,6	
Преображенская . .	33	9	27	3	9	19	58	2	6	
алиева	52	6	11,5	4	8	36	63	6	11,5	
Сизова	58	13	24	3	5	37	63	5	8	

* Число видов только Eupenicillium (и без тех видов, которые помещены в раздел неопределяемых).

** Количество всех видов Penicillia, приведенных в таблице, приблизительное, так как некоторые из них повторяются в нескольких секциях (например, Penicillium matris meae Zal. встречается в секциях Lanata-divaricata и Biverticillata-symmetrica, также и другие).

Известно, что среди группы Asymmetrica встречается и наибольшее число так называемых «активных» штаммов, выделяющих антибиотически действующие вещества.

Необходимым дальнейшим этапом в исследовании изменений, вызываемых в результате длительной культуры у видов Penicillium, должно быть изучение изменения активности штаммов. И, независимо от этого, должны разрабатываться такие методы и условия культивирования грибов, которые позволили бы сохранять их по возможности в неизменном виде или даже изменять их свойства в нужном направлении. Наконец,

[5] См. [5], стр. 310.

третьей задачей должна быть более совершенная систематическая обработка данной группы грибов, особенно с точки зрения оценки значения культуральных признаков как признаков вида.

Выводы

1. В условиях длительной культуры штаммы Penicillium и Aspergillus претерпевают дегенеративные изменения (исчезновение имевшихся склероциев, клейстокарпиев или конидиеносцев и другие).

2. Наиболее подверженными изменениям оказались Penicillium из секций Monoverticillata stricta и Biverticillata symmetrica, т. е. виды, обладающие сравнительно простым строением конидиального аппарата.

3. Наибольшая постоянность в условиях культуры обнаружена у Penicillium из секции Asymmetrica. Представители этой секции обладают сложно построенными, мощно развитыми и дающими большую продукцию конидиеносцами и представлены полнее и шире, чем другие в почвах различного типа и происхождения.

4. Необходима более совершенная систематическая обработка данной группы грибов, особенно с точки зрения оценки значения культуральных признаков как признаков вида.

5. Необходимым дальнейшим этапом исследования должно быть изучение изменений физиологических свойств и в первую очередь активности штаммов Penicillium в условиях длительной культуры и разработка таких методов и условий культивирования, которые позволили бы сохранять их по возможности в неизменном виде или изменять их свойства в нужном направлении.

Московский государственный университет

Получено 8.IV.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Курсанов Л. И. Микология, Москва, 1940.
2. Курсанов Л. И. Пособие по определению грибов из родов Aspergillus и Penicillium. Москва, 1947.
3. Morini Fausto. Sulla forma ascofora del Penicillium candidum Link. Malpighia, anno 2, fascicull 5/6, p. 224, Messina, 1888.
4. Thom, and Church. The Aspergilli. 1926.
5. Thom. The Penicillia. 1930.

РАЗВИВАЮЩЕЕСЯ РАСТЕНИЕ, МИКРООРГАНИЗМЫ И ПРОЧНАЯ СТРУКТУРА ПОЧВЫ

К. И. Рудаков и *М. Р. Биркель*

Уже весьма давно установлена важная роль травянистой растительности в создании прочной структуры почвы (Костычев, 1892). Особенно резко поставлен вопрос о значении растительности, в первую очередь многолетних трав, Вильямсом [1, 2, 3].

Нарастание прочных структурных агрегатов в почве под влиянием культуры травянистых растений начинается уже с 1-го года жизни; это многократно отмечено и доказано различными исследователями.

В 1946 г. на Докучаевской юбилейной сессии (Рудаков [4]) мы развили теорию, в соответствии с которой образование активного перегноя, клеящего и цементирующего почвенные агрегаты, осуществляется при взаимодействии уроновых кислот и микробного протеина при участии ферментов протопектинозно-пектинозного комплекса. Уроновые кислоты, составляющие основную часть уроново-протеидного комплекса, могут явиться результатом микробного синтеза (микробные слизи), а также образовываться при разложении пектиновых веществ межклетников корня. Этот последний путь образования уроновых кислот является наиболее вероятным в первые годы жизни травяного поля. В настоящее время мы имеем возможность провести ряд экспериментальных доказательств нашей теории.

Образование протопектиназы «корневыми» бактериями

Способность продуцировать протопектиназу была проверена нами у микроорганизмов, выделенных Березовой из корней пшеницы и льна (тип Achromobacter radiobacter, тип Bact. macerans), у коллекционных штаммов тех же микробов (Музей живых культур Всесоюзного института сельскохозяйственной микробиологии) и у микроорганизмов, выделенных нашим аспирантом Т. В. Шмыревой из корней тимофеевки и овсяницы. Результаты сведены в табл. 1 (стр. 546).

Биологическое доказательство выделения корневой системой растений растворимых веществ под воздействием бактерий, продуцирующих протопектиназу

Для того чтобы выявить, влияют ли бактерии, продуцирующие протопектиназу, на выделение корневой системой растения органических веществ, был проведен ряд экспериментов. Стерильные семена различных сельскохозяйственных растений (пшеница, лен, капуста) высевались в стерильный кварцевый песок, пропитанный питательным раствором с минимальным (10% нормы) содержанием азота. Песок насыпался в нижнюю часть высоких пробирок с перетяжкой.

Над перетяжкой помещалось затянутое марлей стеклянное кольцо, на котором и раскладывались семена. Контакт между семенами и песком был, таким образом, полностью исключен. Часть засеянных пробирок оставлена стерильными (контроль). В другой части семена в момент высева заражались микроорганизмами, продуцирующими протопектиназу. В качестве таковых были взяты:

1) Achromobacter radiobacter (110);
2) Bac. macerans;
3) Bac. polymyxa.

Таблица 1

Способность микроорганизмов продуцировать протопектиназу *

Наименование и происхождение культуры микробов	Энергия протопектиназы (в часах)
Achromobacter radiobacter Из корней пшеницы (Березова) . . .	6
Achromobacter radiobacter Из корней льна (Березова)	6
Achromobacter radiobacter Музей живых культур	3
Bact. macerans Из корней льна (Березова)	3
Achromobacter (sp.?) Из корней тимофеевки (Шмырева)	1/2
Flavobacterium (sp.?) Из корней тимофеевки (Шмырева)	3

* По методике, описанной Шишеловой [5].

Третья часть пробирок заражалась культурой Azotobacter chroococcum (штамм 53), и, наконец, четвертая часть пробирок заражалась одновременно и бактериями, продуцирующими протопектиназу, и Azotobacter chroococcum. Растения выращивались в течение 3—4 недель, после чего были проведены микробиологические анализы. Опыты преследовали цель выяснить, как будет развиваться Azotobacter в условиях одинарной культуры и совместно с бактериями, продуцирующими протопектиназу. Если в результате жизнедеятельности последних в среду перейдет то или иное количество органических доступных азотобактеру веществ, энергия размножения последнего должна значительно возрасти. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Количество клеток Azotobacter на 1 г песка

Растение	Контроль (стерильно)	Azotobacter chroococcum	Azotobacter chroococcum + Achromobacter radiobacter	Azotobacter chroococcum + Bact. polymyxa	Azotobacter chroococcum + Bact. macerans
Пшеница	Стерильно . . .	782 000	57 449 000	249 000	520 000
		704 000	59 600 000		
Лен	» . . .	8 120	677	7 280	6 676
		4 161	3 900	2 000	6 000
Капуста	» . . .	237 000	428 000	253 000 000	340 000
		279 000		288 000 000	320 000
		190 000	169 000	107 000 000	191 000
		160 000	116 000	107 200 000	11 600

В сосудах, зараженных одним азотобактером, его численность не увеличилась. В сосудах же, зараженных азотобактером и Achromobacter radiobacter (на пшенице), и в сосудах, зараженных азотобактером и Bact. polymyxa (на капусте), численность азотобактера возросла в сотни и тысячи раз.

Вывод ясен: при заражении пшеницы Achromobacter radiobacter и при заражении капусты Bac. polymyxa азотобактер, получая необходимое углеродистое питание, усваивает элементарный азот и энергично размножается. Важно отметить, что не всякая культура микробов, продуцирующих протопектиназу, дает материал для развития азотобактера. Для пшеницы такой культурой оказался Achromobacter radiobacter, для капусты — Bac. polymyxa.

Возникает вопрос: в протопектиназе ли дело, или, быть может, развитие азотобактера обусловливают какие-нибудь другие причины?

Для выяснения этого вопроса был проведен опыт с сухим препаратом протопектиназы. Сухой препарат протопектиназы изготовлен Шишеловой путем осаждения спиртом 10-дневной культуры Bac. carotovorum на картофельном отваре с последующей промывкой.

Препарат обладал очень высокой активностью. Равным образом получен спиртовой осадок из стерильного картофельного отвара. Часть препарата протопектиназы была инактивирована нагреванием до 80°.

Одновременно была выращена пшеница в строго стерильных условиях. Равные весовые количества всех осадков (активная протопектиназа, инактивированная протопектиназа и осадок картофельного отвара) растворены в равных объемах воды. В полученные растворы помещены корни пшеницы [1] и оставлены на 4 часа при 38°. Затем все растворы профильтрованы через бактериальные фильтры (растворы проверены в дальнейшем на стерильность), фильтраты заражены чистой культурой Azotobacter chroococcum и помещены на двое суток в термостат при 28°. Через двое суток подсчитано количество клеток. Результаты приводятся в табл. 3.

Таблица 3

Количество клеток Azotobacter (на 1 мл раствора)

Вариант опыта	Количество клеток Azotobacter через 3 суток	
	1-й опыт	2-й опыт
Обработка препаратом протопектиназы	9 000 000	10 000 000
Обработка инактивированным препаратом протопектиназы	800 000	900 000
Обработка осадком картофельной среды	400 000	500 000

Результаты этого опыта ясно показывают, что при обработке корней препаратом протопектиназы в среду переходят вещества, дающие возможность развиваться Azotobacter. Уже через 3 суток его количество возросло в 20 с небольшим раз.

Химическое доказательство выделения уроновых кислот корнями растений под влиянием бактерий, продуцирующих протопектиназу

Для получения прямого химического доказательства выделения корнями растений продуктов распада пектина под влиянием бактерий, продуцирующих протопектиназу, были проведены следующие опыты.

Стерильные семена различных сельскохозяйственных растений (пшеница, лен, капуста) были высеяны в стерильный кварцевый песок, пропитанный питательным раствором. Как и в предыдущих опытах, песок был помещен в нижней части пробирок с перетяжкой. Семена для устра-

[1] Взяты здоровые растения, выращенные стерильно.

нения контакта с песком помещены в верхней части пробирок на затянутом марлей стеклянном кольце. В момент посева семена заражались культурами бактерий, продуцирующих протопектиназу. Помимо Achromobacter radiobacter, Bac. macerans и Bac. polymyxa, был взят ряд культур бактерий — возбудителей гниения овощей, а также некоторые сапрофиты, продуцирующие протопектиназу.

По окончании опыта в песке определена галактуроновая кислота (по Толленсу, табл. 4).

Таблица 4

Выделение галактуроновой кислоты корнями растений под влиянием бактерий

Инфекция	Галактуроновая кислота (в мг на 100 г песку)		
	пшеница	лен	капуста
Контроль (стерильно)	<0,1	<0,1	<0,1
Achromobacter radiobacter	16,3	7,3	2,6
Bac. macerans	11,1	15,2	5,8
№ 84	12,1	<1,0	—
Bac. carotovorum	12,1	1,76	8,47
Bac. polymyxa	7,7	8,14	93,28
№ 269	8,8	<1,0	—
Bac. mycoides	7,7	1,32	1,0
Bac. polymyxa		15,62	
Bac. asterosporus		7,4	
№ 46	18,26	Растения погибли	—
№ 1 (Культуры, изолированные из «мокрой гнили» картофеля и капусты)	9,24	То же	—
№ 26	12.54	» »	—
№ 89	16,39	» »	—
№ 76	12,98	3,8	—
№ 104	5,94	6,6	20,02
№ 271		7,4	—

Таблица с полной очевидностью показывает, что бактерии, продуцирующие протопектиназу, действуют на пектиновые вещества развивающихся корней. Это действие сопровождается освобождением галактуроновой кислоты, которая обнаруживается в песке.

Выводы

1. Ряд бактерий из числа «корневой микрофлоры» продуцирует протопектиназу.
2. В результате действия этих бактерий на корневую систему растений выделяются органические вещества, дающие возможность интенсивно развиваться Azotobacter.
3. Тот же эффект получается при обработке живых корней препаратом протопектиназы.
4. В числе продуктов, выделяемых под воздействием бактерий живыми корнями растений, доказано присутствие уроновой кислоты.

Всесоюзный институт
сельскохозяйственной
микробиологии
Москва

Получено 29.III.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Вильямс В. Р. Общее земледелие, 1919.
2. Вильямс В. Р. Почвоведение, вып. I—IV, 1914—1922.
3. Вильямс В. Р. Почвоведение, 1946 (1948).
4. Рудаков К. И. Образование гумуса в процессе развития растений, Тр. Юбилейной сессии В. В. Докучаева, 236, 1949.
5. Шишелова Н. А. Роль протопектинозы в инфекционном процессе у растений. Микробиология, XVII, 252, 1948.

ГИБРИДИЗАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ

(Обзор)

К. В. Косиков

Введение

Гибридизация дрожжей имеет свою историю. Наличие полового процесса, давно доказанное у дрожжей (Barker, 1901), открывало реальную возможность осуществить половую гибридизацию в пределах этой группы микроорганизмов. Однако потребовался длительный период времени, связанный с исследованием циклов развития дрожжей и особенно с выяснением значения гапло- и диплофаз [1] и слияния прорастающих спор и клеток между собой, чтобы практически подойти к вопросу гибридизации у дрожжей. Половой процесс у дрожжей и циклы их развития подробно освещены в работах Красильникова (1935) и Кудрявцева (1946), поэтому нам нет необходимости на этих вопросах подробно останавливаться.

Как отмечает Имшенецкий (1946), первые попытки получить гибриды у дрожжей были начаты в 1929—1930 гг. в Советском Союзе микробиологом Филипповым, но они не дали ожидаемых результатов. Несколько позже Имшенецкий продолжил эти исследования с видами дрожжей из рода Zygosaccharomyces. Отбирая отдельные клетки, уже имеющие копуляционные отростки и принадлежащие к различным видам или расам Zygosaccharomyces, автор помещал их в одну и ту же каплю питательной среды. Однако в этих условиях клетки не копулировали, а начинали размножаться почкованием или погибали.

Winge (1935), а также Winge и Laustsen (1937) опубликовали работы по исследованию гапло- и диплофаз и по прорастанию и копуляции спор некоторых видов рода Saccharomyces. В этих исследованиях был применен микроманипулятор для изоляции отдельных спор из асков. Отказавшись от скрещивания гаплоидных вегетативных клеток и использовав широко распространенную у дрожжей способность спор копулировать друг с другом, Винге и Лаустзен (1938, 1939) получили гибриды между различными видами рода Saccharomyces и в одном случае между представителями различных родов (Zygosaccharomyces Priorianus × Saccharomyces cereivsiae). Исследования Винге и Лаустзена, а также и других авторов, получивших гибриды между различными видами дрожжей (Lindegren, 1943; Косиков, 1947 и другие), позволили вскрыть и проанализировать ряд вопросов изменчивости и наследственности, связанных с гибридизацией у этих микроорганизмов.

Методы и техника гибридизации

Как мы уже упоминали, Винге и Лаустзен для получения гибридов дрожжей воспользовались копуляцией прорастающих спор друг с дру-

[1] Предполагается, что споры у дрожжей являются гаплоидными, т. е. имеют одинарное число хромосом. Одна спора, прорастая и размножаясь, дает гаплоидную культуру, если не происходит копуляция между образовавшимися вегетативными клетками или между клеткой и спорой. О такой культуре говорят, что она находится в гаплоидной фазе. При копуляции прорастающих спор или образуемых ими гаплоидных клеток получается диплоидная клетка, т. е. имеющая двойное число хромосом. О вегетативном размножении культуры, образовавшейся из такой клетки, говорят, что она находится в диплоидной фазе.

гом. Этот метод дает вполне надежные результаты, если прорастающие споры не образуют почек до слияния друг с другом. Образовавшаяся зигота в результате копуляции двух спор различных видов при размножении вегетативным путем дает гибридные диплоидные клетки, тогда как почка из одной споры, образовавшаяся до слияния спор, является гаплоидной и, в дальнейшем размножившись, может копулировать с подобной себе гаплоидной клеткой того же вида. В этом случае наряду с гибридными диплоидными клетками в культуре будут и диплоидные негибридные клетки, а также могут быть и гаплоидные клетки, не копулировавшие почему-либо с подобными себе. Поэтому для получения полностью гибридной культуры необходимо проследить под микроскопом период копуляции скрещиваемых спор друг с другом и образование почки зиготой.

Для работы с микроманипулятором Винге применил стеклянную камеру. Камера состоит из круглого кольца высотой 9 мм, диаметр кольца около 28 мм. На двух противоположных стенках кольца образуются отверстия, к краям которых припаиваются открытые стеклянные трубочки длиной около 25 мм. Отверстие трубочки должно быть овальным, с размерами 13 × 6 мм. Как показал опыт нашей работы, размеры камеры могут быть изменены в зависимости от размера наличных покровных стекол или других обстоятельств. Высота кольца камеры может быть доведена до 12 мм, отверстия боковых трубочек до 14 × 9 мм. Края стеклянного кольца камеры шлифуются так, чтобы высота по всей окружности была одинаковой. Кольцо с припаянными боковыми трубочками укрепляется на предметном стекле смесью воска с вазелином. Сверху камера покрывается покровным стеклом, на внутренней стороне которого и производятся все операции по изоляции и скрещиванию спор. Покровное стекло укрепляется на краях камеры вазелином.

Для изоляции спор с помощью микроманипулятора применяются две стеклянные иглы, приготовляемые на микропламени горелки. Конец одной иглы должен быть не толще $2^1/_2$ μ, второй около 7 μ. Камеры так устанавливаются на столике микроскопа, а иглы на микроманипуляторе, чтобы возможно большая площадь центральной части покровного стекла была доступна для работы с иглами.

Культуры дрожжей, предназначенные для скрещивания, высеваются на гипсовый блок или какую-либо подходящую среду для спорообразования. После образования достаточного количества спор приступают к гибридизации. На стерилизованное на пламени горелки покровное стекло наносится стерильно несколько очень мелких капель питательной жидкости. В качестве питательной жидкости лучше всего пользоваться осветленным пивным суслом хорошего качества. В две из крайних капель вносятся аски со спорами из различных культур, предназначенных для скрещивания, после чего покровное стекло переносится на камеру. Когда в одной из капель отбирается соответствующий аск со спорами, с помощью иглы этот аск отделяется от остальной массы клеток и переносится к другой, свободной от дрожжей капле. Тонкая игла накладывается на аск и надавливанием на покровное стекло рассекает его посередине. В результате споры освобождаются и разъединяются в отдельные капли. Если оболочка аска трудно поддается разрыву при надавливании тонкой иглой, рекомендуется усилить давление при помощи толстой иглы и производить осторожные прямолинейные движения тонкой иглой. Такая же операция производится с аском из второй капли, после чего споры из различных асков соединяются по две в одной капле. Убедившись с помощью микроскопа в копуляции прорастающих спор и образовании зиготой диплоидных клеток, производят отсев размножившихся гибридных клеток в пробирку с питательной средой.

Lindegren (1945) предложил другой метод гибридизации у дрожжей, основанный на способности некоторых одиночных спор S. cerevisiae

давать устойчиво гаплоидные культуры. Копуляция между такими клетками внутри культуры не происходит. Однако автору удалось показать, что при известных условиях и при подборе соответствующих гаплоидных культур, возникших из различных одиночных спор, копуляция между гаплоидными клетками может происходить. В совместной культуре таких различных гаплоидных клеток образуются зиготы, дающие начало гибридным диплоидным клеткам. С помощью микроманипулятора они могут быть отобраны и выращены в изолированных каплях среды. При совместном выращивании клеток различных гаплоидных культур не во всех случаях между ними происходит копуляция и образование гибридных диплоидных клеток.

Однако имеется возможность ошибки в методе Линдегрена, так как никогда нельзя быть уверенным, что гаплоидная клетка сама не может превратиться в диплоидную. Такие случаи диплоидизации при проверке метода Линдегрена отмечает Винге. В этом случае среди гибридных клеток могут появиться негибридные диплоидные клетки.

Следует отметить также, что не у всех сахаромицетов этот метод может быть применен. Некоторые виды не дают устойчиво гаплоидных культур, происходящих из одиночных спор. Клетки таких культур копулируют друг с другом, происходит диплоидизация внутри культуры. Это исключает возможность использовать такие культуры для скрещивания. К таким видам, например, относятся, по данным Винге, S. validus, по данным Косикова,— S. ellipsoideus и S. globosus.

Наследование морфологических и физиологических признаков у гибридов

а) Наследование формы клеток и колоний

Винге и Лаустзен (1938, 1939) в своих первых работах по гибридизации дрожжей отмечают, что при скрещивании хлебопекарных дрожжей, относимых авторами к S. ellipsoideus и имеющих элипсовидную форму клеток, с S. validus, отличающимся от S. ellipsoideus удлиненными вегетативными клетками, гибриды характеризуются промежуточной формой клеток. S. Bayanus имеет удлиненные вегетативные клетки; S. cerevisiae — круглые. При скрещивании этих двух видов образуются гибридные клетки, обладающие продолговатой формой, что указывает на доминирование типа клеток S. Bayanus (Lindegren, 1945).

Более разнообразной при гибридизации дрожжей является изменчивость по форме колоний. При изучении изменчивости формы колоний необходимо иметь в виду, что устойчиво гаплоидные культуры, как правило, дают шероховатые, значительно меньшие по размеру колонии, если даже они происходят от диплоидной культуры, дающей гладкие большие колонии.

Надо полагать, что отсутствие полового процесса при образовании гаплоидной культуры, а также несвойственное исходной культуре гаплоидное состояние естественно приводят к пониженной жизнеспособности и связанной с ней изменчивости других признаков и свойств.

Винге и Лаустзен приводят интересные данные по изменчивости формы колоний при гибридизации различных видов рода Saccharomyces. В большинстве случаев гибриды имеют промежуточную форму колоний, в той или иной мере уклоняющуюся к одному из родителей, если исходные виды различаются по этому признаку. Однако авторы отмечают, что при скрещивании датских хлебопекарных дрожжей × S. cerevisiae RII (обе исходные формы имеют гладкие колонии, с еле заметной тонкой радиальной и концентрической исчерченностью) гибриды имеют резко отличную, ярко выраженную шероховатую скульптурную поверхность колонии. Сходные результаты были получены при скрещивании

датских хлебопекарных дрожжей × S. Italicus. В своей работе Winge и Roberts (1948) приводят данные по наследованию формы колоний при скрещивании S. cerevisiae × S. Chevalieri. Культура S. cerevisiae имела гладкую форму колоний, S. Chevalieri — шероховатую. Гибрид первого поколения имел промежуточную форму. Во втором поколении были получены культуры, резко отличные по форме колоний от исходных родительских видов и от гибридов первого поколения. Скрещивание гибридов второго поколения с исходным S. Chevalieri дало дополнительные данные по изменчивости формы колоний.

б) Наследование ферментативных свойств

Во всех случаях согласно известным до сих пор литературным данным по скрещиванию дрожжей, в первом поколении гибридов ферментативные способности всегда наследуются как доминантный признак. Это установлено в отношении наследования свойства сбраживать рафинозу для скрещивания S. validus (+) × S. Italicus (—); S. validus (+) × × датские хлебопекарные дрожжи (1/3 +); S. Mandschuricus (+) × × S. spec. 769 (1/3 +) (Winge и Laustsen, 1939); S. carlsbergensis (+) × × S. globosus (—); S. carlsbergensis (+) × S. chodati (—) (Косиков, 1949); S. ellipsoideus (+) × S. globosus (—); S. ellipsoideus (+) × × S. chodati (—), (Кудрявцев и Косиков, 1947); в отношении наследования свойств сбраживать сахарозу для скрещиваний S. validus (+) × × S. Italicus (—); S. validus (+) × датские хлебопекарные дрожжи (—) (Winge and Laustsen, 1939); S. carlsbergensis (+) × S. globosus (—); S. carlsbergensis (+) × S. chodati (—) (Косиков, 1949); S. ellipsoideus (+) × S. globosus (—); S. ellipsoideus (+) × S. chodati (—) (Кудрявцев и Косиков, 1947); в отношении наследования способности сбраживать мальтозу при скрещивании S. carlsbergensis (+) × S. globosus (—) (Косиков, 1949); S. ellipsoideus (+) × S. globosus (—) (Кудрявцев и Косиков, 1947); S. cerevisiae (+) × S. Chevalieri (—) Winge и Roberts, 1948); в отношении наследования способности сбраживать галактозу при скрещивании S. cerevisiae (+) × S. Bayanus (—) (Lindegren) и в отношении наследования способности сбраживать мелибиозу при скрещивании S. carlsbergensis (+) × S. cerevisiae (—) (Lindegren C., Spiegelman и Lindegren G., 1944).

Гибридные диплоидные клетки первого поколения при вегетативном размножении стойко сохраняют и передают потомству свои свойства сбраживать сахара. Проведенная нами (Косиков, 1948) проверка таких гибридных клеток при скрещивании S. ellipsoideus (сахароза + мальтоза +) × S. globosus (сахароза —, мальтоза —) в количестве 54 культур, каждая из которых образовалась из одной гибридной клетки, показала, что все они хорошо сбраживали и сахарозу и мальтозу.

При образовании гибридной клеткой первого поколения спор происходит расщепление, т. е. разнообразие по признакам, свойственным исходным родительским видам. Культуры, возникшие из таких спор (второе половое поколение), как правило, наследуют ферментативные способности одного из родительских видов или занимают промежуточное положение между обоими исходными видами. Так, в упомянутом выше скрещивании S. ellipsoideus × S. globosus во втором половом поколении нами были получены культуры из отдельных спор, способные сбраживать сахарозу и мальтозу (как и S. ellipsoideus) и не сбраживающие обоих этих сахаров (как и S. globosus). Однако были получены и такие культуры, которые сбраживали сахарозу, но не сбраживали мальтозу, и наоборот, сбраживали мальтозу, но не сбраживали сахарозу.

Формальные генетики считают, что ферментативная система в клетке контролируется генами, что для каждого фермента имеется свой ген,

и если нет соответствующего гена,— фермент не образуется. Исходя из этой «генной гипотезы», каждый гибридный четырехспоровый аск должен содержать 2 споры, несущие признаки одного родителя, и 2 споры, несущие признаки второго родителя, причем «генная теория» требует «чистоты гамет», т. е. чтобы признаки строго наследовались, ибо ген как «единица наследственности» не подлежит «загрязнению» или «дроблению». В том случае, когда ожидаемого расщепления не происходит, допускается, что имеется не один, а большее количество генов, контролирующих один и тот же фермент. Так, например, К. Линдегрен, С. Шпигельман и Г. Линдегрен утверждают, что у S. carlsbergensis имеется 2 доминантных гена, контролирующих продукцию фермента мелибиазы. Винге и Робертс считают, что у S. cerevisiae имеется один ген, контролирующий продукцию галактозимазы, и 3 гена, контролирующих продукцию мальтазы, причем из этих 3 генов 2 обеспечивают сбраживание мальтозы быстро и один — медленно. Однако как Линдегрен, так и Винге приводят в своих работах данные, которые никак не могут быть объяснены с позиции «генной» теории и менделевского расщепления. Например, Винге отмечает, что в скрещиваниях S. Mandschuricus (мелибиаза +) × S. sp. (мелибиаза —), вместо ожидаемого в одном случае расщепления 3 : 1, автор среди 26 культур из одиночных спор вообще не получил никакого расщепления, все культуры сбраживали мелибиозу. Полученный Линдегреном (1945) гибрид S. cerevisiae (галактозимаза +) × S. Bayanus (галактозимаза —) в первом поколении хорошо сбраживал галактозу. Во втором поколении из одиночных спор образовались культуры, быстро сбраживающие и медленно сбраживающие галактозу, в отношении 2 : 2. При дальнейшем анализе выяснилось, что в одном случае медленно сбраживающая культура, образовав споры, полностью утеряла способность сбраживать галактозу. Из проверенных 8 культур, полученных из одиночных спор 2 асков, содержащих по 4 споры, ни одна не сбраживала галактозу. В другом случае такая же медленно сбраживающая галактозу культура, наоборот, при спорообразовании усилила способность сбраживать галактозу. Все проверенные 8 культур из одиночных спор 2 асков, содержащих по 4 споры, хорошо сбраживали галактозу. Оказалось далее, что такие гомозиготные культуры, происходящие из одиночных гаплоидных спор, вопреки всяким «генным теориям», в третьем поколении расщепились на быстро сбраживающие и медленно сбраживающие галактозу в отношении 2 : 2. Автор пытается объяснить эти факты, исходя из им же предложенной гипотезы о цитогенах, однако совершенно очевидно, что и цитогены в данном случае не в силах спасти «генную теорию». Необходимость же привлечения цитогенов в дополнение к хромосомным, ядерным генам лишний раз свидетельствует о несостоятельности «генной теории» вообще. Полученные нами данные в отношении сбраживания сахарозы гибридами S. carlsbergensis (сахароза +) × S. globosus (сахароза —) также не укладываются в схемы менделевского расщепления. Во втором половом поколении было обнаружено большое разнообразие культур по способности сбраживать сахарозу. 32 культуры из одиночных спор, выделенных из 8 асков, содержащих по 4 споры, дали различные отношения по этому признаку в пределах отдельных асков. 1 аск дал отношение 4 : 0; 5 асков дали отношение 3 : 1, и 2 аска дали отношение 2 : 2. Эти отношения были установлены при испытании способности культур сбраживать сахарозу в течение 10 дней. Однако в процессе опыта были выявлены и такие культуры, которые начинали сбраживать сахарозу на 15 и 27-е сутки после посева в среду.

Во втором поколении гибридов S. carlsbergensis × S. chodati были получены культуры из одиночных спор, сбраживающие сахарозу на 7, 11, 22, 30 и 40-е сутки после посева в среду. Среди этих культур второго поколения гибрида были обнаружены также формы (29%), не

сбраживающие мальтозу, хотя оба исходных вида хорошо сбраживали этот сахар.

Когда говорят о менделевском расщеплении «генов» и о «чистоте гамет», то имеют в виду, что в результате расщепления гибридов получаются формы, ничем не отличающиеся от исходных видов по изучаемым признакам. Утверждается при этом, что свойство того или другого родителя всегда наследуется в чистом виде. Факты показывают, однако, что эти утверждения не имеют реальных оснований.

Полученные нами (Кудрявцев и Косиков, 1947) данные по расщеплению во втором половом поколении гибридов при скрещивании S. ellipsoideus × S. globosus по способности сбраживать сахарозу также не дают основания истолковать их как менделевское расщепление. Дело в том, что полученные мной (Косиков, 1947) гибридные культуры второго поколения этого гибрида из одиночных спор проверялись Кудрявцевым на способность сбраживать сахарозу и мальтозу по принятому им методу испытания в течение 10 дней. Если в течение этого срока культура не сбраживала соответствующего сахара, считалось, что она вообще не может сбраживать этот сахар. В этом случае было получено расщепление 2 : 2. Однако уже при самостоятельном, более углубленном исследовании способности сбраживать сахарозу как гибридами, так и исходным видом S. globosus нами (Косиков, 1948а) было установлено, что те гибриды, которые были ранее занесены в графу несбраживающих сахарозу и, следовательно, считались по этому признаку ничем не отличающимися от S. globosus, на самом деле в сильной степени уклонялись от этого родительского вида. Было установлено, что некоторые гибриды, не сбраживающие сахарозу в течение 10 дней, приспосабливаются к сбраживанию этого сахара, если более длительное время культивируются на нем. Приспособление происходит быстрее, если в среду с сахарозой добавить небольшое количество глюкозы, которая хорошо сбраживается всеми видами рода Saccharomyces. При этом выявилось, что такие гибриды, особенно те из них, которые хорошо сбраживают мальтозу, после сбраживания глюкозы значительно быстрее приспосабливаются к сбраживанию сахарозы, чем такие же культуры из одиночных спор исходного вида S. globosus. Таким образом, вместо ожидаемого при менделевском расщеплении появления в четырехспоровом гибридном аске двух спор, дающих культуры, в такой же степени не сбраживающие сахарозу, как и S. globosus, эти культуры занимали промежуточное положение между исходными видами.

В результате расщепление по этому признаку было изменено и вместо ранее наблюдавшегося 2 : 2, было получено в одном случае 3 : 1, а в другом случае приближалось к отношению 4 : 0.

Приведенные экспериментальные данные показывают, что гибридизация отнюдь не сводится к перекомбинации свойств и признаков родительских видов, что процесс спорообразования и слияния прорастающих спор и клеток друг с другом при скрещивании и условия культивирования приводят к глубоким наследственным изменениям организмов. Эти данные наглядно показывают несостоятельность «генных теорий» и утверждений формальных генетиков о существовании менделевского расщепления и о так называемой «чистоте гамет» при скрещивании.

в) Наследование способности синтеза витаминов

Lindegren C. и Lindegren G. (1947) провели работу по изучению наследования у дрожжей способности синтеза витаминов. При скрещивании культур, различающихся по синтезу пантотената, пара-аминобензойной кислоты, тиамина и пиридоксина, как утверждают авторы, было установлено менделевское расщепление на среде Burkholder без прибавления соответствующего витамина. Однако и здесь имеются все основания

считать, что при более детальном исследовании гибридных культур расщепление будет другим. Можно сослаться на работу того же автора (Lindegren и Raut, 1947), которая делает весьма вероятным такое предположение. Авторы исследовали влияние различных синтетических сред на синтез витаминов микроорганизмами. Приведенные в работе данные показывают, что так называемые «дефектные» по синтезу данного витамина культуры (т. е. не имеющие якобы соответствующего гена или имеющие его в рецессивном состоянии) часто не растут на среде не потому, что они не могут синтезировать витамин, а потому что синтетическая среда сама по себе является неполноценной. Улучшение синтетической среды, без добавления соответствующего витамина, приводит в этом случае к нормальному росту такой «дефектной» культуры. Между тем формальные генетики утверждают, что синтез любого витамина контролируется только геном. Таких «генов» столько «накопилось», что даже Линдегрен, являясь поклонником и автором разного рода генных гипотез, требует ограничения в «производстве» количества этих генов, так называемых «vitaminless» мутантов. Приведенные в работе данные показывают, что рост культур в отсутствии соответствующего витамина зависит не только от полноценности синтетической среды, но также и от длительности периода времени, в течение которого ведется наблюдение.

Гибридизация и селекция

Имеющиеся в литературе экспериментальные данные показывают, что гибридизация в пределах рода Saccharomyces может быть успешно использована для получения новых и более продуктивных штаммов дрожжей. В зависимости от объекта работы и поставленной задачи следует учитывать возможные при этом трудности. При гибридизации и селекции, например, пивных и винных дрожжей, трудность возникает в определении качества полученных форм, поскольку нет объективного лабораторного метода их оценки. Например, проблема аромата или букета очень важна, однако определение этого качества в экспериментальной работе по селекции очень сложно. Как на частный случай применения гибридизации в пивоваренном производстве мы можем указать на использование в полузаводских условиях полученных нами (Косиков, 1947) гибридов S. ellipsoideus × S. globosus и в дальнейшем S. carlsbergensis × S. globosus. Гибриды эти во втором половом поколении из одиночных спор дают культуры, хорошо сбраживающие все моносахара и мальтозу, но не сбраживающие сахарозу. При обсуждении возможности использования полученных гибридов в производстве, Веселовым было высказано предположение, что такие культуры можно применить для получения сладкого пива. Проведенная под его руководством разработка соответствующего технологического процесса в Институте пивоваренной промышленности дала положительные результаты. Добавленная в сусло сахароза не сбраживалась гибридами, в результате получалось сладкое пиво. Первый гибрид S. ellipsoideus × S. globosus относился к пылевидным дрожжам, поэтому был заменен в процессе работы другим гибридом S. carlsbergensis × S. globosus, обладающим лучшими технологическими качествами.

Менее сложной представляется задача получения продуктивных форм гибридов для спиртовых и дрожжевых заводов. Проверка качества полученных гибридов здесь менее сложна и может быть широко использована в экспериментальных, лабораторных условиях. Winge (1939) указывает, например, что полученный им гибрид S. cerevisiae R II × датские хлебопекарные дрожжи оказался продуктивнее родителей по накоплению биомассы. Некоторые заводы используют эти гибриды как лучшие дрожжи по сравнению с ранее применявшимися.

Весьма важным обстоятельством в деле использования гибридизации для получения более продуктивных форм является наличие гетерозиса

у гибридов дрожжей. Винге приводит данные по продуктивности гибрида S. validus × датские хлебопекарные дрожжи. Эти данные показывают гибридную силу по количеству сброженного сахара и по накоплению биомассы. По количеству сброженного сахара гибрид превышает наиболее продуктивного родителя на 8,3%, по накоплению биомассы на 8,6%. Устойчивость в сохранении и передаче свойств потомству гибридными диплоидными клетками при вегетативном их размножении делает вполне реальным использование гетерозиса у дрожжей в производственных условиях в гораздо большей мере, чем это возможно, например, у животных и растений, ибо дрожжи можно бесконечно долго размножать вегетативным путем, не вызывая спорообразования. Подбирать соответствующие пары для скрещивания, дающие наибольшую продуктивность гибридов по интересующим производство признакам, и создавать наиболее оптимальные условия для их культивирования и продуктивности — вот путь, по которому следует вести селекцию у дрожжей, применяя метод гибридизации.

Другой точки зрения на использование гибридизации для селекционных целей придерживается Линдегрен (1943). Он считает, что обязательным условием успешной селекции у дрожжей является применение инбридинга, который якобы, во-первых, усиливает желательный признак и, во-вторых, устраняет нежелательные, рецессивные гены и делает клон гомозиготным для желательной линии. Однако приведенные Линдегреном данные по инбридингу на продуктивность показывают, что уже в третьем поколении родственное разведение при изолировании отдельных четырехспоровых асков показало снижение урожайности биомассы дрожжей на 17%. Заключительный и наиболее важный этап в предлагаемой автором системе селекции состоит в скрещивании различных инбредных линий, обладающих желательными качествами. Правда, Линдегрен тут же предупреждает, что результат такой гибридизации не может быть предсказан: «во-первых, потому, что инбридинг имеет дело со случайностью в селекции генов-модификаторов. Во-вторых, определенный признак может быть взаимно исключен». Имеется в виду, что, например, высокая урожайность по биомассе дрожжей может быть результатом физиологического механизма, который одновременно редуцирует хлебопекарную силу (подъем теста), и поэтому такая культура не может быть использована в том случае, когда необходимо сочетать урожайность по биомассе с хлебопекарными качествами дрожжей. В результате, когда автор перешел к описанию проведенной им гибридизации между инбредными линиями, то урожайность оказалась, очевидно, настолько незначительной, что цифровые данные о ней не приводятся. Автор ограничился только замечанием, что «она была очень низкой». Так была объективно доказана, против желания самого автора, несостоятельность и бесплодность «генной» теории в применении к методам селекции у дрожжей.

О половых различиях спор и гаплоидных клеток у дрожжей (гомо- и гетероталлизм)

Применив методику изоляции спор путем рассечения асков с помощью микроманипулятора, Winge (1935, 1937) детально изучил процесс прорастания спор у различных видов рода Saccharomyces. Наблюдая копуляцию между гаплоидными клетками и образование жизнеспособных спор в культуре из одной споры, Винге пришел к заключению, что у изучавшихся им видов нет полового различия между сливающимися клетками и спорами, что здесь нет вопроса о + - или — -клетках. При изучении спорообразования у S. cerevisiae Винге наблюдал в некоторых случаях значительное понижение спорообразования и жизнеспособности спор в культурах из одной споры и объяснил это явление цитоплазма-

гическим эффектом инбридинга. Линдегрен с сотрудниками (1943a, 1943b, 1944), исследуя спорообразование и копуляцию спор и клеток у S. cerevisiae, пришел к совершенно другим выводам. В противоположность взглядам Винге он утверждает, что у S. cerevisiae имеются генетические факторы, определяющие половые различия клеток и спор, что мы имеем здесь дело с гетероталлизмом. Согласно взглядам Линдегрена, у S. cerevisiae имеются аллеломорфные факторы типов скрещивания (обозначенные им как a/a), которые только в гетерозиготном состоянии дают культуры, способные образовать четырехспоровые аски с жизнеспособными спорами. Культуры, у которых эти факторы находятся в гомозиготном состоянии (например, полученные из одиночных спор) не могут образовать «нормальные» аски, а если их и образуют, то преимущественно двухспоровые и с нежизнеспособными спорами.

Наши данные (Косиков, 1947, 1948б), относящиеся к видам S. ellipsoideus и S. globosus и к гибридам между этими видами, не дают никаких оснований применить гипотезу Линдегрена для их объяснения. Аски четырех-, трех- и двухспоровые, происходящие из исходных культур и культур из одиночных спор, давали в одинаковой степени высокую жизнеспособность изолированных из них спор. И говорить здесь о специальных «генах», якобы определяющих «пол», и тем самым — типы скрещиваний, конечно, не приходится.

Дополнительные данные, полученные Линдегреном (1943b, 1945) показали, что гаплоидные клетки одной линии при смешении с такими же гаплоидными клетками другой линии в некоторых комбинациях и при соответствующих условиях могут копулировать и давать гибриды. Внутри таких линий копуляция между гаплоидными клетками не происходит.

Эти данные, касающиеся только некоторых, устойчивых гаплоидных культур, полученных из одиночных спор в пределах одного вида S. cerevisiae (культурные дрожжи), были подтверждены Винге (1948). Линдегрен объяснил эти данные избирательной копуляции гаплоидных клеток теми же аллелями типов скрещивания.

Нам представляется, что и в этом случае говорить об аллелях типов скрещивания, или о «генах самостерильности», как Линдегрен их называет, нет никаких оснований. Исходя из того, что автор относит выработку системы функционирования аллелей типов скрещивания к природным условиям существования, естественно было бы ожидать, что эти аллели типов скрещивания будут проявляться в большей степени у менее культурных видов дрожжей, нежели у наиболее культурного S. cerevisiae. Исследованные нами хорошо спорулирующие виды S. ellipsoideus и S. globosus, применяющиеся в кустарных условиях производства вина в Армении, несомненно, ближе стоят к природным условиям, чем S. cerevisiae. Тем не менее никаких признаков наличия определяющих пол факторов в том смысле, как их представляет Линдегрен, у этих видов обнаружить не удалось.

Из этого мы отнюдь не хотим сделать вывод, что у изучавшихся нами видов и у других дрожжей нет половой поляризации. Поскольку имеет место половой процесс, то естественно допустить и половую поляризацию. Однако наши данные показывают, что природа такой поляризации не имеет ничего общего с представлениями формальных генетиков об аллелях типов скрещивания или генах, якобы определяющих пол.

Использование в производстве по преимуществу вегетативных форм размножения дрожжей приводит к потере приспособительного значения спорообразования (сохранение вида в неблагоприятных природных условиях) и к понижению способности спорообразования и жизнеспособности спор. В результате изменившихся условий жизни соответственно изменяется и природа организма.

О так называемых «цитогенах» у дрожжей

Как мы уже отмечали в разделе о наследовании ферментативных свойств у дрожжей, формальные генетики утверждают, что выработка фермента в клетках контролируется генами, находящимися в хромосомах. Однако самими формальными генетиками были получены факты, которые не могут быть объяснены на основе этой «генной» теории.

Из опытов Spiegelman и Lindegren (1945) следует, что при скрещивании S. carlsbergensis, обладающего способностью адаптироваться к сбраживанию мелибиозы с S. cerevisiae, не обладающими этой способностью, среди культур гибридов второго поколения, полученных из отдельных спор, имелись как способные адаптироваться к сбраживанию мелибиозы, так и не способные. Из четырехспорового аска 2 споры адаптировались к сбраживанию мелибиозы, как и культуры родительского вида S. carlsbergensis, а 2 споры вели себя сходно с S. cerevisiae. Отсюда был сделан вывод, что клетки S. carlsbergensis имеют соответствующий «ген», способный сбраживать мелибиозу, когда в ней есть нужда, а клетки S. cerevisiae не обладают таким геном или он находится у них в рецессивном состоянии. Но эти же авторы установили, что если все операции по скрещиванию упомянутых выше видов дрожжей и изоляцию гибридных спор проводить в присутствии мелибиозы, то все 4 споры из четырехспорового гибридного аска дают культуры, способные ферментировать мелибиозу, причем эта способность сохраняется до тех пор, пока в субстрате имеется в наличии мелибиоза. После перенесения культур на среду, лишенную мелибиозы, вновь могут адаптироваться к сбраживанию мелибиозы только 2 из 4 культур, а остальные 2 теряют эту способность. Эти факты показали, что 2 из 4 гибридных спор, не обладающие «геном», предназначенным для выработки энзима мелибиазы, давали культуры дрожжей, способные сбраживать мелибиозу, а следовательно, и продуцировать энзим мелибиазу, пока в питательной среде имелась мелибиоза. Это вызвало затруднения и осложнения в «генной» теории. До сих пор считалось, что все зависит от гена и ген находится в ядре, в хромосоме. А тут выходит, что те реакции, которые должны зависеть только от соответствующего гена, происходят и в отсутствие этого гена. Пришлось прибегнуть к новым предположениям и спекуляциям для спасения генной теории. Считаясь с очевидным фактом, что решающая роль в репродукции фермента клеткой принадлежит воздействию на нее специфического субстрата, в данном случае мелибиозы, авторы утверждают, что начало процесса образования энзима все же зависело всецело от наличия «гена» в гибридной клетке. Цитоплазма клеток сбраживающих культур содержит самовоспроизводящиеся частицы, представляющие собой либо самый энзим, либо его нуклеопротеинового предшественника, который по существу является цитоплазматическим представителем гена (Spiegelman и Kamen, 1946). Следовательно, то, что происходит в цитоплазме при взаимодействии с субстратом, контролируется и направляется если не самим «геном», то его представителями, агентами. Линдегрен (1945) для объяснения обсуждаемых фактов предложил свою цитогенную теорию. Согласно этой теории, в клетке, имеющей ген, обеспечивающий сбраживание мелибиозы, всегда существует предшественник цитогена (protocytogene), находящийся в цитоплазме. Предшественник цитогена продуцируется геном и является относительно неспецифическим веществом. При взаимодействии с мелибиозой предшественник цитогена превращается в цитоген, который в присутствии мелибиозы обладает способностью саморепродуцироваться. Из неспецифического вещества он превращается в специфический фермент — мелибиазу. При образовании гибридной клеткой четырехспорового аска только в 2 споры из 4 попадут гены, способные продуцировать предшественников цитогена, так как эти гены находятся

в хромосомах. Что же касается самих цитогенов, то, находясь в цитоплазме, они при спорообразовании распределяются по всем спорам. Цитоген — нестойкое образование. При удалении из питательной среды специфического субстрата он разрушается и уже не может снова восстанавливаться без соответствующего гена. Развивая свои спекулятивные предположения, Линдегрен предложил новую теорию о двойственной природе гена (1946).

Спекулятивная гипотеза Линдегрена и Шпигельмана о цитогенах и объяснения с помощью этой гипотезы полученных ими экспериментальных данных вызывают возражения даже со стороны формальных генетиков. Winge и Roberts (1948), изучая гибриды дрожжей S. cerevisiae × S. Chevalieri во втором половом поколении по способности сбраживать мальтозу и галактозу, получили то самое явление, которое Линдегрен и Шпигельман наблюдали в связи с ферментацией мелибиозы. Они объяснили это явление исходя из известных фактов по адаптивной изменчивости, обусловленной наличием в среде специфического сахара. Наряду с использованием результатов экспериментальной работы по наследованию адаптивного фермента мелибиазы Линдегрен и Шпигельман основывали свои гипотезы на данных, полученных в отношении фермента галактозимазы при скрещивании S. Bayanus × S. cerevisiae. Они считали S. Bayanus неспособным ферментировать галактозу, тогда как на самом деле, по данным Винге, дрожжи этого вида ферментируют галактозу, только для этого нужно около 14 дней контакта их клеток с галактозой достаточно высокой концентрации.

Критикуя гипотезу Линдегрена о цитогенах, Винге остается полностью на формально генетических позициях, признавая существование гена со всеми теми свойствами, которые ему приписываются.

Нам представляются необоснованными и глубоко ошибочными теоретические представления как о цитогенах, так и о генах. Эти представления становятся в явное противоречие с фактами при активном, действенном методе изучения изменчивости и наследственности у микроорганизмов.

Проведенные нами исследования (Косиков, 1948) на гибридах S. ellipsoideus × S. globosus в отношении наследования по двум признакам — по способности сбраживать мальтозу и сахарозу (S. globosus не обладает способностью сбраживать мальтозу и сахарозу, S. ellipsoideus хорошо сбраживает эти сахара) показали, что оба эти свойства четко наследуются; во втором половом поколении из гибридного четырехспорового аска 2 споры дают культуры, сбраживающие тот или иной сахар в течение первых двух дней, и 2 споры — культуры, не сбраживающие этих сахаров, если определение способности сбраживать сахара проводилось в течение 10 дней. Последующие, более детальные исследования способности приспособления гибридов и исходного вида S. globosus к сбраживанию сахарозы показали (Косиков, 1948а), что расщепление по этому признаку во втором половом поколении не соответствует представлениям о «чистоте гамет», находится в явном противоречии с этими представлениями. Было установлено, что гибриды, отнесенные к группе не сбраживающих сахарозу, могут приспособиться к сбраживанию этого сахара, причем продолжительность времени, требующаяся для приспособления, не одинакова для таких гибридов. Те гибриды, которые не сбраживают сахарозу, но хорошо сбраживают мальтозу, значительно быстрее адаптируются к сахарозе, чем гибриды, не сбраживающие ни сахарозу, ни мальтозу. Культуры исходного вида S. globosus, полученные из одиночных спор, требуют еще более значительного периода времени для приспособления к сахарозе. Но сам факт полученного нами приспособления к сахарозе культур S. globosus представляет особенный интерес. Проведя биохимическим путем определение активности саха-

разы у различных форм дрожжей, Юркевич[1] не обнаружил какой-либо активности этого фермента в клетках исходного штамма S. globosus. Следовательно, мы должны допустить, что при культивировании на среде, содержащей сахарозу, в клетках S. globosus образуется фермент сахараза. Специфический субстрат в данном случае выступает как активный фактор, направленно вызывающий возникновение новой, специфической ферментной системы в клетке.

В свете полученных нами экспериментальных данных особенно ясно обнаруживается спекулятивность, необоснованность и метафизичность рассуждений Линдегрена и Шпигельмана о специальных генах и цитогенах, ответственных за продукцию ферментов в клетке. Культуральное поведение и биохимическое определение культур S. globosus показало, что они не обладают способностью сбраживать сахарозу и не имеют фермента сахаразы. Данные по гибридизации с S. ellipsoideus подтвердили это предположение. Поэтому нет никаких оснований предполагать наличие у S. globosus какого-то специального «гена», вырабатывающего фермент сахаразу. Тем не менее у некоторых культур этого вида удалось вызвать способность сбраживать сахарозу при культивировании их в соответствующих условиях на сахарозе. Ген и приписываемые ему свойства оказались совершенно ненужной спекуляцией, ибо без этого гена можно вызвать образование фермента и его репродукцию в клетке с последующей передачей этого свойства потомству.

Институт генетики
Академии Наук СССР
Москва

Получено 28. IV. 1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Имшенецкий А. А. Экспериментальная изменчивость микроорганизмов. Успехи совр. биологии, **21**, вып. 1, 1946.
2. Косиков К. В. Гибриды между Saccharomyces ellipsoideus × S. globosus. Микробиология, XVI, вып. 6, 1947.
3. Косиков К. В. Генетический анализ гаметогенеза (спорообразования) у дрожжей рода Saccharomyces. ДАН СССР, LXI, № 4, 1948.
4. Косиков К. В. Гибридизация как фактор изменчивости у дрожжей. Природа приспособления дрожжей к сбраживанию сахарозы. ДАН СССР, LXIII, № 5, 1948а.
5. Косиков К. В. Спорообразование и жизнеспособность спор у Saccharomyces ellipsoideus, S. globosus и у гибридов между этими видами. Тр. Ин-та генетики АН СССР, № 15, 1948б.
6. Красильников Н. А. Половой процесс у дрожжей. Микробиология, IV, вып. 1, 1935.
7. Кудрявцев В. И. Циклы развития, филогенез и классификация дрожжей. Микробиология, XV, вып. 4, 1946.
8. Кудрявцев В. И. и Косиков К. В. Исследование ферментативных свойств у некоторых межвидовых гибридов рода Saccharomyces. Микробиология, XVI, вып. 6, 1947.
9. Barker, Ph. A conjugating yeast (Zygosaccharomyces, N. gen.). Proc. Roy. Soc., **6**, 345, 1901.
10. Lindegren C. and Lindegren G. Selecting, inbreeding, recombining and hybridizing commercial yeast. J. Bact., **46**, 405, 1943.
11. Lindegren C. Segregation, mutation and copulation in Saccharomyces cerevisiae. Ann. Mo. Bot. Gard., **30**, 453, 1943a.
12. Lindegren C. A new method for hybridizing yeasts. Proc. Nat. Acad., **29**, 306, 1943b.
13. Lindegren C., Spiegelman S. and Lindegren G. Mendelian inheritance of adaptive enzymes in yeast. Proc. Nat. Acad., **30**, 346, 1944.
14. Lindegren C. Mendelian and cytoplasmic inheritance in yeast. Ann. Mo. Bot. Gard., **32**, 107, 1945.
15. Lindegren C. A new gene theory and an explanation of the phenomenon of dominance to mendelian segregation of the cytogene. Proc. Nat. Acad., **32**, 68, 1946.

[1] Устное сообщение.

16. Lindegren C. and Raut C. The effect of the medium on apparent vitamin-synthesing deficiencies of microorganisms. Ann. Mo. Bot. Gard., **34**, 75, 1947.
17. Lindegren C. and Lindegren G. Mendelian inheritance of genes affecting vitamin synthesing ability in Saccharomyces. Ann. Mo. Bot. Gard., **34**, 95, 1947.
18. Spiegelman S., Lindegren C. and Lindegren G. Maintenance and increase of a genetic character by a substrate cytoplasmic interaction in the absence of the specific gene. Proc. Nat. Acad., **31**, 95, 1945.
19. Spiegelman S. and Kamen M. Genes and nucleoproteins in the Synthesis of enzymes. Science, **104**, 581, 1946.
20. Winge Ö. On haplophase in Saccharomyces. Comp. Rend. Lab. Carlsberg. Sér. physiol., **21**, 77, 1935.
21. Winge O. and Laustsen O. On two types of spore germination and on genetic segregations in Saccharomyces, demonstrated through single-spore culture. Ibidem, **22**, 99, 1937.
22. Winge O. and Laustsen O. Artificial species hybridization in yeast, Ibidem, **22**, 225, 1938.
23. Winge O. and Laustsen O. On 14 new yeast types, produced by hybridization. Ibidem, **22**, 337, 1939.
24. Winge O. and Roberts C. Inheritance of enzymatic characters in yeasts, and the phenomenon of longterm adaptation. Ibidem, **24**, 263, 1948.

Л. С. ЦЕНКОВСКИЙ — ОСНОВАТЕЛЬ МИКРОБИОЛОГИИ В РОССИИ

Б. Е. Райков

Шестьдесят с небольшим лет назад, 8 октября 1887 г., скончался замечательный русский ученый Лев Семенович Ценковский, который положил у нас в 50-х годах прошлого века начало серьезному изучению низших организмов. Деятельность Ценковского как ученого заслуживает весьма высокой оценки. К. А. Тимирязев называл Ценковского «замечательным ученым и увлекательным профессором» и считал Ценковского «родоначальником всех современных русских ботаников». Геккель еще при жизни Ценковского называл его «выдающимся протистологом». Историк ботаники Сакс отозвался о нем как об «основателе научной бактериологии», а известный миколог Брефельд так высоко ценил тщательность и точность его наблюдений, что, желая похвалить кого-либо из сотрудников своей лаборатории, говорил: «Это так же верно, как если бы сам Ценковский это подтвердил».

В настоящее время, когда история отечественной науки привлекает у нас большое внимание и стала усиленно разрабатываться, крупнейшее значение Ценковского как прогрессивного русского ученого, замечательного исследователя и основателя новой для России научной дисциплины — микробиологии — стало особенно ясным. К этому надо присоединить также недавно выясненную историческую роль Ценковского в утверждении и развитии в России десцедентной теории. В настоящее время стало известным, что Ценковский развивал эволюционное учение в биологии еще до появления теории Дарвина и не только в своих специальных ученых работах, но и на своих публичных лекциях [1].

Лев Семенович Ценковский происходил из бедной семьи и родился 1 октября 1822 г. в Варшаве. 17 лет он окончил Варшавскую губернскую гимназию и поступил в Петербургский университет на математическое отделение. Однако случайно прослушанная лекция профессора зоологии С. С. Куторги настолько увлекла юного студента, что он перешел на естественное отделение. Это и определило его дальнейшую научную судьбу. Вот как описывает сам Л. С. Ценковский этот замечательный поворот в своей жизни.

«В блестящем изложении даровитый профессор познакомил слушателей со строением куриного яйца, обратил внимание на пятнышко, находящееся на желтке, на так называемый насед, и указал, что в нем развивается зародыш, а желток служит ему лишь только пищей. Затем изложил вкратце, как постепенно из однообразного материала развивается новое существо. Я, как сегодня, помню эту замечательную лекцию. И я тогда впервые узнал, что животное строится по известному плану, что однообразное вещество наседа распадается на несколько пластов, из которых развиваются целые системы органов, что кровь появляется раньше кровеносных сосудов, что сердце уже очень рано заметно в виде бьющейся, пульсирующей точки, что человек, как бы он велик впоследствии ни был, развивается подобным же образом. После этой знаменательной для меня лекции я вообразил, что можно постигнуть все тайны природы и тотчас же побежал в правление уни-

[1] См. статью Б. Е. Райкова [1].

верситета и просил перевести меня на естественное отделение. С этой поры я служил верой и правдой естественным наукам почти половину столетия».

Материальные условия жизни Ценковского в Петербурге в период его студенчества были очень тяжелыми, здоровье его было надорвано непривычным климатом, но тем не менее он с большим увлечением и настойчивостью продолжал заниматься естественными науками и в 1844 г. окончил университет со степенью кандидата. В течение двух ближайших лет, живя в Петербурге и перебиваясь кое-как случайными занятиями, он успел выдержать магистерский экзамен и защитил диссертацию под названием «Несколько фактов из истории развития хвойных». Выбор темы этой диссертации очень характерен для направления интересов молодого ученого. В ботанике в ту эпоху процветало узкосистематическое направление, представителем которого был учитель Ценковского — профессор Петербургского университета Шиховский. Физиологии растений как отдельной отрасли тогда еще не существовало. То же надо сказать и об эмбриологии растений. Работы талантливого Чистякова и отца русских физиологов Фаминцына появились много позднее — в 60-х годах.

Знаменательным для этого периода умственного роста Ценковского было его вступление в круг петербургских ученых, преимущественно академиков, группировавшихся вокруг прославленного эмбриолога Бэра. Узнав, что молодой ученый с любовью занимается ботаникой, Бэр ввел его в свой частный кружок. По воспоминаниям Ценковского, атмосфера в кружке была восторженная: «Все говорили о путешествиях,— рассказывал Ценковский,— открытиях, обсерваториях, улучшенных приборах. Кружок переживал в это время волнение, вызванное учением Шванна о клетке. Почтенные старцы бредили микроскопом, наслаждались удачными препаратами, что им не всегда удавалось. Что тогдашний академический кружок действовал на молодых ученых разжигающим образом — это само собой понятно. В этом кружке я в первый раз увидел алтарь, воздвигнутый чистой науке. Много света и тепла исходило от него, многие молодые ученые... запасались там любовью к науке на всю жизнь». Душой этого кружка был Бэр, которому в это время было уже под 60 лет. Ценковский описывает его характерными чертами: «Бэр представлял воплощение настоящего жреца науки — когда он говорил, то казалось, что он передает что-то священное, что нужно хранить и лелеять». Это влияние знаменитого биолога на молодого ученого следует особо отметить. В результате общения с Бэром и его кружком Ценковский, по его собственному выражению, получил в научной работе тот «высокий тон, который не оставлял его всю жизнь».

Иначе отнесся к молодому ученому его бывший учитель профессор ботаники Шиховский, человек крайне узкий, хотя и преданный своей специальности. Когда возник вопрос о доцентуре Ценковского в университете, Шиховский высказался против и тем разрушил все планы Ценковского. Последнему не оставалось ничего другого, как покинуть в поисках заработка Петербург. Ценковский воспользовался предложением Академии Наук поехать в качестве натуралиста в экспедицию, направлявшуюся в Северную Африку, к истокам Белого Нила для поисков золотых россыпей в этом районе. Два года пребывания в Африке (1847—1848) немного дали материала по тем вопросам, которые интересовали молодого ботаника. Пришлось ему испытать различные невзгоды и лишения, связанные с путешествием по диким странам. Ценковский болел малярией, был вынужден голодать, пить нездоровую воду. На одном этапе пути он настолько ослабел, что его привязывали к верблюду. Научные результаты этой экспедиции для Ценковского выразились в том, что он собрал довольно много представителей флоры Судана [3].

В конце 1848 г. молодой ученый вернулся в Петербург. Но его по-

пытки устроиться здесь на работу попрежнему оказались безуспешными. Из его писем, относящихся к этому периоду, видно, что он терпел настоящую нужду, ходил в изношенном платье, рваной обуви, думал о каждом куске хлеба. В конце концов пришлось вторично уехать из Петербурга — на этот раз в Ярославль, где Ценковскому удалось устроиться на кафедру ботаники Демидовского лицея. В Ярославле Ценковский пробыл четыре года и выказал себя талантливым преподавателем, завоевавшим любовь и уважение студентов.

В 1854 г. в жизни ученого, которому исполнилось всего 32 года, произошел перелом. После смерти профессора Шиховского Ценковский получил предложение занять его кафедру в Петербургском университете. Молодой ученый начал свои лекции в Петербурге с половины 1855 г., и в старой университетской аудитории сразу повеяло новым духом. Вместо утомительных лекций его предшественника, который сумел сделать ботанику самым скучным для студентов предметом и не шел далее систематического изложения сухих мелких фактов без всяких обобщающих выводов, перед студентами появился лектор во всеоружии новейших научных открытий, отличный оратор, энтузиаст научного знания, умевший развернуть перед слушателями широкие увлекательные горизонты. Дело преподавания ботаники в университете было запущено, новое научное оборудование отсутствовало, и Ценковскому, помимо чтения лекций, пришлось много потрудиться, чтобы достать нужные приборы, приготовить необходимые для занятий препараты и т. д. Результаты не заставили себя ждать. Общий восторг слушателей был наградой молодому ученому за его труды. Как преподаватель Ценковский обладал выдающимися достоинствами: он умел соединить живость изложения с глубиной содержания. Он никогда не щеголял показным красноречием, его лекции были сжаты и насыщены фактическим материалом, но этот материал давал основу для общих выводов. Слушателей пленяла не внешняя форма изложения, а стройность и логичность содержания лекций.

Скоро Ценковский вошел в славу, как один из самых блестящих преподавателей университетской науки, и его привлекли к чтению публичных лекций, которые в конце 50-х годов получили в Петербурге большое развитие.

После неудачной Крымской войны и смерти Николая I, самодержавный деспотизм которого сковывал и мертвил все живые силы страны, наступило общественное оживление конца 50-х и начала 60-х годов. Это прогрессивное движение не замедлило отразиться и на деле народного образования. Среди многих просветительных начинаний той эпохи немалую роль сыграли упомянутые выше публичные лекции на различные научные темы, премущественно по естествознанию, организованные в Петербурге по частному почину для широкой публики. Лекции эти читались лучшими профессорами в одном из центральных зал Петербурга — в здании Пассажа и пользовались шумным успехом. Они привлекали не только учащуюся молодежь, но и людей разнообразного звания. Инициатором этого любопытного предприятия, которое отвечало всеобщему умственному оживлению, связанному с повышением интереса к естественным наукам, было либеральное издательство «Общественная польза». Вот что рассказывает об этом предприятии Тимирязев, бывший тогда студентом: «Задачей этого оригинального «торгового дома» было способствовать обнаружившейся в обществе «настоятельной потребности в изучении естественных наук», путем издания подходящих книг и организации публичных научных курсов. Являясь результатом совершенно частного почина, лишенного к тому же всякой филантропической подкладки, это предприятие было одним из характерных учреждений своего времени и сыграло несомненную роль в развитии русской науки. Изящный, специально отстроенный зал был, вероятно, первым вполне

приспособленным к чтению лекций, с необходимой обстановкой для опытов и демонстраций при помощи волшебного фонаря. В антрактах красная драпировка между белыми колоннами, составлявшая фон аудитории, раздергивалась, как бы приглашая публику в ряд помещений, своего рода педагогический музей, где она могла познакомиться с диковинной для нее химической посудой, физическими приборами, естественно-историческими коллекциями, так как в круг деятельности «торгового дома» входила и торговля этими почти неизвестными публике предметами. Читавшиеся в этой аудитории курсы могли бы принести честь и любому европейскому научному центру» [2].

В числе приглашенных устроителями лекторов был и Ценковский, который не ограничился одним-двумя выступлениями, но прочитал в 1858 г. целый связный курс из пяти лекций. Возможно, что этот курс был повторен не раз — точных сведений об этом не сохранилось. Эти публичные лекции Ценковского имели огромный успех, который объясняется не только блестящим изложением молодого профессора, но и самым содержанием лекций. Они носили общее название «Физиология растений», но на самом деле тема была взята гораздо шире и в равной мере касалась и ботаники и зоологии. По существу это был курс общей биологии растений и животных. Успеху лекций содействовало и то обстоятельство, что Ценковский касался здесь многих из тех вопросов, над которыми он сам научно работал (пограничные области между растительным и животным миром, вопрос о самопроизвольном зарождении и т. п.). Содержание этого курса, который не был напечатан, дошло до нас случайным образом в записи его усердного слушателя и почитателя Э. Брандта, который был в то время студентом медицины, а впоследствии профессором зоологии в Медико-хирургической академии в Петербурге. Содержание публичных лекций Ценковского весьма замечательно потому, что Ценковский построил свое изложение на эволюционной основе и закончил цикл лекций утверждением идеи трансформизма как основы жизни всего органического мира. Если принять во внимание, что указанный курс был прочитан до появления «Происхождения видов» Дарвина, то становится очевидным, что перед нами немаловажный факт из истории русской науки [2].

Пребывание Ценковского в Петерубрге было благотворно для его научной работы. Он работал здесь чрезвычайно интенсивно и напечатал ряд исследований, посвященных изучению простейших, и свою докторскую диссертацию: «О низших водорослях и инфузориях» [4], где дал историю развития многих низших форм, захватив в круг своих исследований как растительные, так и животные организмы. «Я начал,— рассказывает он о себе,— с многоклетных водорослей, от них перешел к одноклетным, и самыми нечувствительными переходами очутился в области животного царства».

В ту эпоху эта область исследования была одной из самых темных областей науки. В разное время было описано много низших форм, но этот эмпирический материал представлял собой бессвязную груду фактов. Отдельные стадии развития низших организмов были описаны как особые виды, связь этих форм между собой не была прослежена и т. д. Ценковский задался целью прежде всего установить циклы развития низших организмов и выяснить их генетические отношения. Избранный им путь был нов и труден, но Ценковский уверенно пошел по этому пути. «Постоянная борьба в добывании знаний, по его собственному выражению, вырабатывает настойчивость, столь необходимую при научных занятиях». Диссертация Ценковского и ряд его последующих работ петербургского периода пролили яркий свет в эту малоизвестную область. Он изучил развитие целого ряда водорослей (Spaeroplea annuli-

[2] Подробнее об этом курсе лекций Ценковского см. в указанной статье Райкова [1].

na, Vaucheria sessilis и др.), выяснил историю развития Flagellata, проследил явление инцистирования у инфузорий и пр. При этом ему не только удалось установить генетические отношения между отдельными группами низших организмов, но и в значительной степени способствовать выяснению важнейшей проблемы — связи между животным и растительным мирами. После работ Ценковского стало ясным, что резкой границы между этими двумя мирами не существует, что имеется ряд форм, которые являются как бы переходными. При защите этого взгляда Ценковскому пришлось выдержать немалую борьбу, причем против него решительно ополчился и его бывший учитель зоолог Куторга, который считался крупным авторитетом в науке и также занимался одно время низшими организмами. Тем не менее молодой ученый сумел отстоять свое мнение и в своих последующих работах не уставал приводить все новые и новые доказательства правильности своего взгляда.

Для Ценковского как научного работника, помимо его личных дарований и научных достижений, очень характерна одна черта, которая роднит его с Павловым, Сеченовым, Пироговым и другими крупными русскими естествоиспытателями: необыкновенная добросовестность в научной работе. Из биографии Пирогова известно, например, что, будучи профессором Дерптского университета и находясь среди немцев, которые с предубеждением относились к русскому ученому, он не стеснялся не только говорить на лекциях, но и подробно публиковать о своих диагностических ошибках, чем совершенно обезоружил своих недоброжелателей. Для Ценковского характерен следующий случай. В 1856 г. в одной работе, напечатанной в трудах Академии Наук [5], он описал развитие одного одноклеточного организма, который он назвал крахмальной монадой (Monas amyli). Это простейшее неизвестно откуда появляется на зернах крахмала, которые в течение долгого времени остаются под водой. Ценковский решил, что здесь имеется налицо доказательный случай самопроизвольного зарождения, в которое безусловно верили многие натуралисты той эпохи, в том числе и сам Ценковский. Исследования русского ученого подтвердил и такой авторитет западной науки, как Негели и другие. Однако спустя год Ценковский проверил свои наблюдения и пришел к другому выводу — что никакого самопроизвольного зарождения в данном случае не имеется. Тогда он немедленно опубликовал о своей ошибке в том же самом академическом издании [6] и еще раз рассказал об этом в своей речи «О самозарождении», предназначенной для произнесения на годичном акте в Петербургском университете 8 февраля 1859 г. [7].

Пребывание Ценковского в Петербургском университете, оставившее такой яркий след в научной жизни этого учреждения, продолжалось недолго — всего четыре года. Он работал чрезвычайно интенсивно, не щадил своего здоровья, и в северном климате хронический туберкулез, которым наш знаменитый протистолог страдал всю жизнь, обострился, и ему пришлось прекратить лекции и ехать в Ниццу. Зарубежный период жизни Ценковского продолжался около пяти лет. В Петербург он решил не возвращаться и с тех пор работал на юге, сперва в Одессе — в качестве профессора вновь организованного Новороссийского университета (1865—1871), а затем в Харьковском университете (1871—1887), который был последним этапом его плодовитой деятельности.

В нашу задачу не входит подробное описание жизненного пути Ценковского. Достаточно отметить, что и в Одессе и в Харькове он оставался все тем же энтузиастом науки, прекрасным лектором и замечательным организатором учебных занятий студентов. Новороссийский университет обязан ему устройством первой ботанической лаборатории, которая была оборудована лучше, чем во всех остальных русских университетах того времени. Ценковский был первым в России профессором, который стал преподавать ботанику с микроскопом в руках. В 60-х годах

микроскоп был еще научной новинкой. Микроскопы стоили дорого и производились немногими заграничными фирмами. Ценковскому так хорошо удалось обставить ими свою лабораторию, что в ней могли одновременно заниматься 35 студентов. На лекции по ботанике, которые читал Ценковский (он вел анатомию и физиологию растений), приходили не только слушатели его курса, но и студенты с других факультетов, которых пленяла содержательность и широта его объяснений. Следует отметить, что Ценковский был одним из первых в России профессоров-естественников, которые придавали руководящее значение не лекциям, а практическим занятиям своих слушателей, и стремился придать таким занятиям студентов самостоятельный, исследовательский характер. Увлеченные этой работой студенты, забыв о положенных по расписанию сроках, сидели в ботанической лаборатории с утра до вечера. Профессор был всегда в курсе их занятий и в свою очередь старался держать их в курсе последних достижений науки, особенно в области излюбленной ими протистологии. Пребывание Ценковского в Одессе связано с открытием им в 1870 г. Новороссийского общества естествоиспытателей, причем он был избран президентом общества, и основанием в 1871 г. в Севастополе морской биологической станции, в организации которой он принял самое близкое участие и которая в значительной мере обязана ему своим возникновением.

Отъезд Ценковского из Одессы в Харьков был истинным горем для его слушателей и всех друзей науки. По рассказам очевидцев, когда он уезжал, студенты провожали его не только до вокзала, но и дальше по железной дороге.

Совершенно теми же чертами отмечено и пребывание Ценковского в Харькове, где он работал последние 16 лет своей жизни. Студенты носили его на руках — не только в переносном, но и в буквальном смысле. В 1886 г. во время празднования юбилея Ценковского толпа студентов посадила любимого профессора в кресло и пронесла его по улице в его рабочий кабинет. Это торжество происходило всего за год до смерти Ценковского.

Что касается тематики научных исследований Ценковского, выполненных им во время пребывания за границей, а также в одесский и харьковский периоды его жизни, то он оставался верен избранной им области низших организмов — растительных и животных. В начале 60-х годов он усердно занимался изучением миксомицетов (1862, 1863), выясняя их строение и развитие, причем установил генетическую связь между миксомицетами и монадами [8]. Весьма основательно продолжал он работать над группой Flagellata, описав много новых форм. При этом Ценковский попытался генетически связать жгутиконосцев с группой Palmellaceae (студенистые водоросли), опираясь на существование студенистой стадии развития у таких форм как Euglena, Chlamydomonas и др. (1870, 1871) [9].

В начале 70-х годов Ценковский детально изучил интересный одноклеточный организм — ночесветку (Noctiluca miliaris), от присутствия которой зависит явление свечения моря. При этом им была описана анатомия ночесветки и выяснена история ее развития [10].

Немало труда Ценковский положил на изучение развития радиолярий, для чего специально ездил в Неаполь и в Мессину. Ему удалось установить многие важные факты в этой области. Между прочим он впервые описал симбиоз радиолярий с живущими внутри них так называемыми «желтыми клетками», причем установил, что эти клетки являются самостоятельными организмами, которые продолжают существовать после смерти радиолярии, растут и размножаются (1871).

Из сказанного видно, что, работая в пограничной области между мирами — растительным и животным, Ценковский — по специальности ботаник — оставил след и в области зоологии. Из чисто ботанических

работ Ценковского надо упомянуть о ряде его исследований, сделанных им в 70-х годах и посвященных так наз. пальмелевому состоянию различных низших водорослей, т. е. остуденению их в процессе развития, когда вокруг организмов образуется особая слизистая оболочка [11].

Описывая эти разнообразные формы и изучая их развитие, Ценковский не ограничивался процессом простого накопления фактов. Он всегда стремился осветить эти факты теоретически, причем в основу полагал идею генетического родства между организмами. Если он был трансформистом еще до появления учения Дарвина, то после опубликования теории последнего он сразу стал в ряды горячих приверженцев этого учения. Несмотря на разнообразие тем, над которыми работал наш замечательный исследователь, все его труды связаны единством мысли. Таким образом, он не только положил у нас начало серьезному изучению низших организмов, но вместе с тем явился в своей специальной области и одним из первых русских борцов за дарвинизм. Его университетские лекции по ботанике, которые он читал в Петербурге, Одессе и в Харькове, строились на эволюционной основе.

В 1866 г. Ценковскому, в бытность его профессором Новороссийского университета, пришлось даже публично выступать за дарвинизм на диспуте, который имел место при защите докторской диссертации доцента Яновича «О развитии перитециев у Pleospora herbarum». Автор диссертации стоял на дарвинистической точке зрения, что вооружило против него одного из реакционно настроенных профессоров — зоолога Маркузена. Последний, по происхождению финский швед, постарался провалить диссертацию Яновича, но встретил умелое противодействие со стороны Ценковского. Возник горячий спор, в котором столкнулись противники и сторонники дарвинизма. Надо полагать, что это был первый публичный диспут в защиту дарвинизма в России. Бывшая на диспуте публика горячо поддержала докторанта и его защитника. В результате Янович был утвержден в ученой степени доктора.

В конце своей жизни, работая в Харьковском университете, Ценковский занимался преимущественно микробиологией, причем особенно заинтересовался возбудителем сибирской язвы — Bac. anthracis. В данном случае Лев Семенович руководился не только научными соображениями, но и практическими интересами отечественного сельского хозяйства, так как сибирская язва производила большие опустошения среди домашних животных и наносила громадный вред нашему скотоводству, особенно на юге. Движимый этим интересом, Ценковский в 1882 г. поехал в Париж, имея командировку от Вольно-экономического общества, с целью поработать у самого Пастера и научиться его методу сибиреязвенных прививок. Однако, к крайнему огорчению Ценковского, оказалось, что практическая методика Пастера засекречена, и прославленный француз отказался допустить Ценковского в свою лабораторию. Попытки русского ученого поработать в других парижских лабораториях тоже не имели успеха, и лишь с трудом ему удалось устроиться в лаборатории Бальбиани, где он и занялся техникой приготовления прививочных вакцин. Однако проникнуть в тайну пастеровских прививок от сибирской язвы ему так и не удалось и по возвращении в Россию пришлось создавать эту методику самостоятельно. Это стоило Ценковскому нескольких лет усиленного труда, сопряженного с риском для жизни и всевозможными препятствиями и трудностями. Он ставил опыты прививки приготовленной им предохранительной вакцины на овцах. После ряда неудач ему удалось в 1883 г. добиться положительных результатов, которые были продемонстрированы перед ветеринарными врачами и различными официальными лицами. Так, согласно опыту, поставленному в 1884 г., из 40 овец, зараженных сибирской язвой, 30 овец, получивших прививку, остались в живых, тогда как из остальных 10, оставленных без прививки, пало 9 и лишь одна уцелела, так как обладала, повидимому,

природным иммунитетом. Однако, когда разработанная Ценковским методика была применена в более широких размерах, причем вакцинации были подвергнуты тысячи голов скота, оказалось, что в иных случаях иммунитет получается неполный. Это зависело от непостоянства вакцин, которые при хранении изменяли свои свойства. Неудачи дали повод к злостным толкам по адресу ученого и пересудам, которые крайне тяжело отразились на самочувствии Ценковского. Доброжелатели даже советовали ему совсем бросить все это дело и не расстраивать себя в старости. В эту эпоху Ценковскому было уже за 60 лет.

Серьезным препятствием в работе был, кроме того, недостаток в денежных средствах. Херсонское земство, которое субсидировало опыты Ценковского, оказывало ему крайне незначительную поддержку, так что ему приходилось работать при самых нищенских лабораторных условиях, вкладывая свои личные средства, которые исчерпывались университетским жалованием. Он не имел даже возможности приобретать нужных для работы кроликов и ухитрился заменять их сусликами. «В этот период своих работ,— рассказывает один из сотрудников Ценковского — Скадовский,— Л. С. напоминал мне студента, который продает последние сапоги и покупает книжку, чтобы выдержать экзамен». Однако настойчивость и любовь к науке все превозмогли и «экзамен» был выдержан Ценковским блестяще. В 1886 г. ему удалось наконец, выяснить причину нестойкости вакцин и принять меры к ее устранению. Осенью этого года было подвергнуто вакцинации стадо в 1500 овец с отличными результатами, и Ценковский мог опубликовать результаты этого опыта, указав с полной уверенностью, что «предохранительные прививки сибирской язвы большим стадам овец вполне удаются у нас при помощи полученных мною вакцин», и что «самое грозное препятствие — непостоянство свойств вакцин — устраняется сохранением их в глицерине» [12]. Интересно, что полученный Ценковским иммунитет овец к сибирской язве оказался наследственным: 78% ягнят, рожденных от привитых родителей, также оказались застрахованными от сибирской язвы. Повидимому, Ценковский первый в России стал заниматься вопросом о наследственности иммунитета.

Этот успех был поворотным пунктом в работе Ценковского над сибирской язвой. Его противники вынуждены были сложить оружие, официальные органы поспешили ассигновать средства для продолжения его работ и возместили ему понесенные им лично расходы, а министерство государственных имуществ отпустило в 1887 г. значительную по тому времени сумму в 5000 р. на устройство в Харькове специальной бактериологической станции, о чем самоотверженный ученый давно мечтал.

Однако Ценковскому уже не удалось воспользоваться плодами своей научной победы. Здоровье его стало быстро слабеть, причем у него появились признаки водянки. Его отправили в Лейпциг к знаменитому в то время патологу профессору Вагнеру, который констатировал у больного рак печени. Через несколько недель, 25 сентября (8 октября) 1887 г. Лев Семенович скончался и похоронен там же в Лейпциге, так как у семьи ученого-бессеребренника не оказалось никаких средств для перевозки его тела на родину. Похороны были — без речей, более чем скромные: на них присутствовали только близкие покойного и несколько русских студентов, которые учились в Лейпциге.

Ученые заслуги Ценковского отмечены избранием его членом-корреспондентом нашей Академии Наук. Кроме того, он состоял почетным членом большинства наших университетов и ученых обществ.

История жизни и трудов Ценковского весьма поучительна, воскрешая перед нами высокий моральный облик ученого-новатора, самоотверженного борца за науку, за благосостояние Родины.

Получено 26. VII. 1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Райков Б. Е. Лев Ценковский как трансформист. Тр. Ин-та истории естествознания, АН СССР, III, 1949.
2. Тимирязев К. А. Развитие естествознания в России в эпоху 60-х годов, стр. 48, Москва, 1920.
3. Ценковский Л. С. Отчет о путешествии в северо-восточный Судан. Географич. изв., № 3, 1850. На польском языке Gazeta Warszawska № 88—122, 1853.
4. Ценковский Л. С. О низших водорослях и инфузориях. СПб., 1856.
5. Ценковский Л. С. Zur Genesis eines einzelligen Organismus. Bull. phys.-mathém. Acad. Sci. St.-Pétersb. XIV, N 17, 1856.
6. Ценковский Л. С. Über mein Beweis für die Generatio primaria. Bull. Acad. Sci. St.-Pétersb., XVII, 1858.
7. Ценковский Л. С. О самозарождении. СПб., 1859.
8. Ценковский Л. С. Zur Entwickelungsgeschichte der Myxomyceten. Jahrb. wiss. Bot., III, No. 2, 1862.
9. Ценковский Л. С. Über Palmellaceen und einige Flagellaten. Arch. mikroskop. Anatomie, VI, 1870.
— О студенистых водорослях и некоторых жгутиковых. Тр. II съезда русск. естествоисп. и врачей в Москве, 1871.
10. Ценковский Л. С. Über Noctiluca miliaris. Bull. phys.-mathém. Acad. Sci. de St.-Pétersb. IX, 1873.
11. Ценковский Л. С. О пальмелевом состоянии водорослей. Протоколы V съезда естествоиспыт. и врачей в Варшаве, 1876 и другие работы того же периода.
12. Ценковский Л. С. Отчет о прививках антракса в больших размерах. Сб. Херсонск. земства, III, 1886.

РЕФЕРАТЫ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ

Ященко Л. С. **Влияние солей металлов на уксуснокислое брожение.** Труды Днепропетровского сельскохозяйственного института, т. II—III, стр. 123—127, Днепропетровск, 1948.

Испытывалось влияние различных стимуляторов на скорость уксуснокислого брожения.

Были испытаны $Na_2B_4O_7$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $Fe(SO_4)_3$, Na_2MoO_4, KJ, которые вводились в питательную среду, которая затем заражалась культурой Bact. Pasteurianum.

Из всех испытанных веществ значительно повышали выход уксусной кислоты только соединения бора (на 61,4% по сравнению с контролем). Другие соли повышали выход на 7,2—27%. Было замечено, что ускорение брожения происходило в первые 91—120 часов, тогда как в дальнейшем выход уксусной кислоты был таким же, как и в контроле.

Автор считает, что увеличение выхода уксусной кислоты происходит только за счет количественного увеличения числа бактерий, рост и размножение которых стимулируются добавляемым бором.

А. Фатеев

Квасников Е. И. и Хроликова В. Г. **Новые расы дрожжей для виноделия Узбекистана.** Доклады АН Узб.ССР, 1948, стр. 27—33.

Экологические условия района налагают свой отпечаток на жизнедеятельность дрожжей. В районах виноделия среди диких форм дрожжей встречаются расы, обладающие высокими бродильными качествами, давая вино, способное противостоять бактериальным заболеваниям в процессе его хранения.

Авторы получили 170 рас Sacch. ellipsoideus, отобранных из местных природных источников (почва, свежие и сушеные ягоды и фрукты, соки, бродящее сусло) и выделили из них три расы: Вир-3, Рц-6, Саперави-46, которые можно использовать для производства высококачественных вин. Выделенные расы вполне отвечали требованию виноделия местных районов Узбекистана — наряду с глубоким сбраживанием сахаров, сусла и стойкостью к высоким температурам Средней Азии расы давали полное осветление вина (полнота осаждения) с образованием плотного осадка (трудно взмучиваемого) при значительной стойкости к автолизу, что предотвращает появление так называемых ростовых веществ в готовом вине, необходимых для жизнедеятельности бактерий.

Все эти свойства препятствовали развитию бактериальных заболеваний в готовом вине в процессе его хранения.

Авторы считают, что для виноделия следует изыскивать местные экологические расы дрожжей, как наиболее приспособленные к сбраживанию сырья данного района, могущие противостоять заболеваниям, специфичным для местных условий виноделия.

А. Фатеев

Agarwal P. N. a. Peterson W. H. **Utilization of non-sugar carbon of molasses by food yeasts.** (Использование пищевыми дрожжами углерода, не относящегося к углеводам мелассы). Arch. Biochem., vol. 20, No. 1, pp. 59—75, 1949.

При получении пищевых дрожжей на природных субстратах выход дрожжей обычно вычисляется на основании заданного или сброженного сахара. Такое вычисление ошибочно, так как в расчет не принимаются другие органические соединения, присутствующие в субстрате. Авторы исследовали способность использовать углерод на сахаристых соединениях мелассы дрожжами: Saccharomyces cerevisiae N 13, Torulopsis utilis N 3 и Candida arborea.

Различные образцы осветленной прогреванием с суспензией $Ca(OH)_2$ мелассы (содержание углерода углеводных соединений от 17—20%, углерода неуглеводных соединений — от 6—12%) добавлялись в определенных концентрациях в среды с разными питательными солями и с так называемыми ростовыми веществами. Брожение проводилось при 30°, для улучшения аэрации колбы встряхивались в качалке. Продолжительность опытов измерялась от 4 до 40 часов. По окончании опыта определялся вес сухих дрожжевых клеток, редуцирующие сахара, этиловый спирт, общий углерод. Оказалось, что около 90—96% сахара мелассы сбраживается в течение первых 8 часов брожения, но рост дрожжей продолжается и после исчезновения сахара. При этом S. cerevisiae и C. arborea начинают использовать углерод неуглеводных соединений только после исчезновения сахара, а T. utilis использует углерод неса-

харных соединений даже тогда, когда в среде еще имеется сахар. Использование несахарного углерода повышается с нарастанием общего количества дрожжей и достигает для S. cerevisiae 21%, для T. utilis — 37% и для C. arborea — 35%.

Сорт мелассы, а также добавление в среду различных питательных солей или так называемых ростовых веществ не оказывали существенного влияния на процесс использования углерода несахарных соединений.

Л. Осницкая

Abrams R., Hammarsten E., Reichard P. a. Sperber E. **Tracer studies of nitrogen assimilation in yeast** (Исследования ассимиляции азота дрожжами с помощью меченого азота). Journ. Gen. Physiol., vol. 32, No. 3, pp. 271—279, 1949.

В настоящей работе меченый азот N^{15} был использован для того, чтобы проследить образование протеинов и пуринов нуклеиновых кислот в дрожжах.

Работа проводилась с культурой Torulopsis utilis, которая вначале выращивалась на средах, богатых азотом и бедных углеродом или, наоборот, богатых углеродом, бедных азотом — для того, чтобы получить дрожжи с разным содержанием азота, низким (до 4,5%) и высоким (до 9%). Затем суспензия дрожжей вносилась в среду, содержащую наряду с прочими питательными солями $(NH_4)_2SO_4$ с известным процентом N^{15}. В этой среде дрожжи выдерживались в течение определенного промежутка времени при 30°, после чего отделялись от среды, тщательно промывались, высушивались и обрабатывались таким образом, чтобы получить фракции, содержащие протеин, гуанин, аргинин, аденин. В каждой из этих фракций определялся процент N^{15} (в масс-спектрометре). Данные показали, что заметный переход азота из среды в протеины или пурины у дрожжей, выращенных на средах, бедных углеродом, не происходит. При выращивании дрожжей, бедных азотом, на аммиачной среде отмечалось, что после довольно длительного периода покоя дрожжи быстро синтезируют протеины. Этот процесс сопровождается превращением пуринов полинуклеотидов, причем в последних появляется N^{15}. Авторы считают, что превращение полинуклеотидов связано с процессом использования аммиака дрожжами. Если содержащие N^{15} дрожжи растут и размножаются на обычном аммиачном азоте, то общее количество N^{15} в дрожжах остается постоянным.

Л. Осницкая

Segal W. and Wilson P. W. **Hydroxylamine as a source of nitrogen for Azotobacter vinelandii** (Гидроксиламин как источник азота для Az. vinelandii). J. Bact. v. 57, No. 1, pp. 55—60, 1949.

Гидроксиламин, добавленный в безазотистую среду для азотобактера разлагается, превращаясь в аммиак. Этот процесс ускоряется с повышением температуры и с увеличением кислотности. Азотобактер потребляет гидроксиламин лишь постольку, поскольку он превращается в аммиак. Сам по себе гидроксиламин токсичен для азотобактера в концентрации более 2 микрограмм на мл. В более низких концентрациях он не токсичен и не утилизируется. Таким образом, гидроксиламин вряд ли может являться промежуточным продуктом при азотфиксации.

И. Работнова

Stadtman E. K., Stadman T. C. and Barker H. A. **Tracer experiments on the mechanism of synthesis of valeric and caproic acids by Clostridium Kluyveri** (Опыты с мечеными атомами по механизму синтеза валерьяной и капроновой кислот у Clostridium Kluyveri). Biol. Chem., v. 178, No. 2, pp. 677—82, 1949.

Clostridium Kluyveri способен конденсировать этиловый спирт и масляную кислоту в капроновую кислоту. Несколько лет назад было установлено, что C^{14} карбоксила масляной кислоты не переходит в карбоксильную группу капроновой кислоты (Barker H. и др. Proc. Nat. Acad. Sc. **31**, 373, 1945) — факт, говорящий в пользу образования капроновой кислоты путем присоединения карбоксильного углерода масляной кислоты к α-углероду спирта.

Применив ту же методику, авторы обнаружили C^{14} в β- положении и таким образом подтвердили это предположение.

Кроме того они изучали превращение пропионовой кислоты (65,1 *M*) с меченым карбоксильным углеродом и этилового спирта (91,4 *M*). После инкубирования почти весь C^{14} был обнаружен в пропиловом спирте (14,5 *M*) и валерьяновой (45,0 *M*) и гептановой (3,4 *M*) кислотах. Синтез валерьяновой кислоты осуществлялся в результате конденсации между карбоксильным углеродом пропионовой кислоты и двууглеродным соединением, образовавшимся из спирта. Капроновая кислота не может быть получена посредством конденсации двух молекул пропионовой кислоты. Жирные кислоты с двумя, четырьмя и шестью атомами углерода образуются, по мнению авторов, только при наличии этилового спирта.

Авторы считают возможным использовать Cl. Kluyveri для получения с хорошим выходом препаратов валерьяновой кислоты с меченым углеродом в различных положениях.

Т. Борисова и Е. Грищенко

Rosenblum E. D. and Wilson P. W. **Fixation of isotopic nitrogen by Clostridium** (Фиксация изотопного азота Clostridium). J. Bact. v. 57, No. 4, pp. 413—414, 1949.

Исследовалась фиксация изотопного азота N_2^{15} 15-ю различными видами из рода Clostridium. Бактерии выращивались на среде с триптоном и глюкозой, 1 мл такой культуры добавлялся к 15 мл безазотистой среды Виноградского. К безазотистой среде добавлялся 1 мл дрожжевой воды на литр как источник витаминов. Культуры помещались в атмосферу азота, содержащую N_2^{15} на 6 дней. Затем определялось содержание изотопного азота в культуре. Оказалось, что из 15 видов только 3 не фиксировали азот: Cl. acidiurici, Cl. perfringens и Cl. sporogenes. Остальные фиксировали, хотя и слабо. Наиболее активными в отношении азотфиксации оказался Cl. Pasteurianum, а также Cl. felsineus.

И. Работнова

Sure B. a. House Fr. **Protein utilization of various dried food yeasts** (Использование протеинов различных сухих пищевых дрожжей). Arch. Biochem., vol. 20, No. 1, pp. 55—59, 1949.

В литературе отмечалось, что протеины дрожжей легко усваиваются крысами и что количество содержащихся в дрожжах протеинов достаточно для питания собак. Авторы изучили с этой точки зрения одну культуру пивных и 4 культуры пищевых дрожжей. Высушенные при пастеризующей температуре небродящие дрожжи были проанализированы на содержание протеинов ($N \times 6{,}25$), тиамина, рибофлавина, золы и влаги. В рацион, даваемый подопытным крысам, дрожжи вносились в таком количестве, чтобы концентрация протеинов равнялась 5, 8 и 10%. По окончании опыта определялся азотный баланс, количество переваренных протеинов и процент усвоенного организмом азота. Оказалось, что если добавлено 5% протеинов, то 91—92% их перевариваются организмом, а азота усваивается от 66 до 89% — в зависимости от взятой культуры дрожжей. При 8% протеинов — переваривается 86—91%, а усваивается 66—82%. Расхождение в данных по количеству усвоенного азота (так называемая «биологическая величина») авторы объясняют индивидуальным различием дрожжей по азотистым соединениям.

Л. Осницкая

Novelli G. D., Flynn R. M. a. Lipmann F. **Coenzyme A as growth stimulant for Acetobacter suboxydans** (Коэнзим А как ростовое вещество для Acetobacter suboxydans) J. Biol. Chem., vol. 177, No. 1, pp. 493—494, 1949.

Еще ранее было показано, что пантотеновая кислота, входящая в коэнзим А, не активна по отношению к Lactobacillus arabinosus и усиливает рост последнего только после воздействия на коэнзим А кишечной фосфатазы. Между тем рост A. suboxydans в присутствии коэнзима А, выделенного из сердечной мышцы, резко усиливается, и притом в гораздо большей степени, чем это можно было бы ожидать, судя по содержанию в нем пантотеновой кислоты.

Поскольку коэнзим А вызывает гораздо большее усиление роста A. suboxydans (пропорциональное его содержанию), чем пантотеновая кислота, и поскольку усиление это сходит до уровня действия пантотеновой кислоты при расщеплении коэнзима А кишечной фосфатазой, авторы приходят к убеждению, что коэнзим А является для A. suboxydans гораздо более мощным фактором роста, чем пантотеновая кислота, и считают возможным, несмотря на некоторые расхождения в свойствах, отождествление ростового фактора Cheldelin с коэнзимом А ($M = 800 \pm 50$) или его дериватом.

Е. Грищенко

Stokes J. L., Koditschek L. K., Rickes E. L. and Wood T. R. **Factors affecting the rate of growth of Lactobacillus casei.** (Условия, влияющие на скорость роста Lactobacillus casei). J. Biol. Chem., v. 178, No. 1, pp. 93—101, 1949.

Некоторые синтетические и полусинтетические среды, содержащие полный набор безусловно необходимых витаминов и аминокислот, не в состоянии обеспечить оптимальный рост Lactobacillus casei. Реферируемая статья посвящена влиянию стрепогенина (триптический гидролизат казеина) и некоторых других факторов на рост L. casei в подобных средах.

Из приведенных авторами данных видно, что трипсиновый гидролизат казеина активен при низких концентрациях (до 1 мг на 10 мл) в начале роста, тогда как фракция L печеночного экстракта действует эффективнее его в более высоких концентрациях (от 5 до 50 мг и выше на 10 мл среды) при дальнейшем развитии культуры.

Полное угнетение роста аспарагином (0,05—0,25 мг на 10 мл) снимается небольшим количеством стрепогенина (0,05 мг гидролизата казеина).

Авторам удалось получить штамм L. casei, нормально растущий и без стрепогенина. Однако в этом случае оказалось необходимым добавление аспарагина (0,4 мг).

Был выращен также штамм, способный к росту в отсутствие и стрепогенина и аспарагина. Как и исходный штамм, он угнетался аспарагином, действие которого снималось казеиновым гидролизатом.

Триптический гидролизат казеина, кипятившийся в течение 24 часов с обратным холодильником при pH = 1, терял свое стимулирующее действие, но вновь обретал его при добавлении аспарагина. То же относится и к фракции L печеночного экстракта Вильсона. Для обратной активации стрепогенина вместо аспарагина можно взять глютамин — но в стократном количестве.

Авторы подчеркивают тесную связь между аспарагином и стрепогенином с точки зрения их участия в обмене.

По всей видимости она сводится (хотя сами авторы и не делают подобного заключения) к взаимоотношениям, характерным для ферментной системы какого-либо организма и конкурирующего с ней антибиотика.

Е. Грищенко и Т. Борисова

Rickes E. L., Koch P. J. and Wood T. K. **Additional observations on the rate of growth of Lactobacillus casei.** (Дополнительные наблюдения над скоростью роста Lactobacillus casei). J. Biol. Chem., v. 178, No. 1, pp. 103—11, 1949.

Для дальнейшего выяснения роли аспарагина и стрепогенина в обмене Lactobacillus casei авторы разработали среду, обладающую вполне определенным химическим составом. В 10 мл ее объема содержится: 4 мг *dl* — триптофана, 1 мг *l* — лизина, по 2 мг *dl* — аланина, *l* — аргинина, *dl* — аспарагиновой кислоты, *l* — цистина, гликокола, *l* — гистидина, *l* — оксипролина, *dl* — изолейцина, *dl* — лейцина, *dl* — метионина, *dl* — норлейцина, *dl* — фенилаланина, *l* — пролина, *dl* — треонина, *l* — тирозина и *dl* — валина, 2,5 мг *l* — аспарагина, 20 мг *dl* — серина, 20 мг *l* — глютаминовой кислоты, 100 мг безводной декстрозы, 60 мг безводного уксуснокислого натрия, по 0,1 мг аденина, гуанина и урацила, по 10 мг K_2HPO_4 и KH_2PO_4, 4 мг $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ по 0,2 мг NaCl, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,25 мг $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 2,5 мг аскорбиновой кислоты, по 4 γ рибофлавина, HCl — тиамина, никотиновой кислоты и пантотеновой кислоты, 0,1 γ птероилглютаминовой кислоты, 0,025 γ биотина, по 10 γ пиридоксамина и пиридоксина, 2,0 γ *p*-аминобензойной кислоты и 100 γ инозитола.

Скорость роста Lactobacillus casei на этой среде не повышалась при добавлении источника стрепогенина (триптического гидролизата казеина).

По мнению авторов, входящие в состав среды аспарагин, серин и глютаминовая кислота являются предшественниками стрепогенина.

Разработанную ими среду авторы рекомендуют для быстрого нефелометрического или титрометрического анализа веществ, необходимых для роста Lactobacillus casei.

Е. Грищенко и Т. Борисова

Henre E. J., Carlson, A. S. and Hamilton D. M. **Crystalline amylose from cultures of pathogenic yeast (Torula histolytica).** (Кристаллическая амилоза из культур патогенных дрожжей Torula histolytica). J. Biol. Chem., v. 177, No. 1, pp. 289—293, 1949.

Авторам удалось выделить из патогенного дрожжеподобного грибка Torula histolytica кристаллический полисахарид (91% чистоты), благодаря которому в присутствии иода этот организм окрашивается в интенсивный синий цвет. По всем испытанным показателям (действие ферментов, реакция с иодом, осаждение амиловым спиртом и др.) полученное вещество относится к группе амилоз.

Выделение его осуществлялось следующим путем. Культура, выращенная в течение 5 дней при 25° на среде, содержавшей 1% глюкозы, 0,1% $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% KH_2PO_4, 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и 0,002 мг% солянокислого тиамина, доводилась до pH = 7 и нагревалась 30 минут при 70—80°. После осаждения добавлялись 2,5 объема спирта. Осадок отделялся центрифугированием и трижды экстрагировался при 93° 15 мин. 0,02 *M* ацетатным буфером pH равным 6,0. К каждому литру объединенного экстракта ($^1/_{10}$ объема культуральной среды), нагретого до 93°, добавлялись 80 мл пентозола (смесь 5 изомеров амилового спирта), после чего жидкость перемешивалась 12 часов при 30°. Кристаллы отделялись на скоростной центрифуге, перекристаллизовывались путем обработки пентазола и высушивались в вакууме над $CaCl_2$ при 25°.

Е. Грищенко

СОДЕРЖАНИЕ XVIII ТОМА

Александрова И. В. см. Кононова М. М. 42
Аронес С. см. Работнова И. . . 509
Артемьев Г. В. Передача „израстания" семенной капусты при трансплантации 177
Бейлин И. Г. Грибные болезни сеянцев и саженцев (Обзор) 377
Биркель М. Р. см. Рудаков К. И. 545
Богданова В. см. Мантейфель А. Я. 118
Бондаренко-Зозулина М. И. Строение молодых клеток неспороносных бактерий 346
Бычковская А. Л. Аэробная регенерация льняной мочильной жидкости в высоком слое 425
Гамалея Н. Ф. К 90-летию со дня рождения. 97
Гамалея Н. Ф. Памяти почетного академика 201
Гаузе Г. Ф. О правизне — левизне у Bacillus mycoides. I. Географическое распространение и некоторые физиологические свойства правозавитых и левозавитых форм. 154
Горленко М. В. Итоги изучения бактериальных болезней растений в СССР за 30 лет (1917—1947) (Обзор) 71
Горленко М. В. и Воронкевич И. В. Возбудители бактериальных пятнистостей томатов и мака 257
Дикасова Е. Т. Метод электрофореза в исследовании грены тутового шелкопряда на присутствие в ней вируса желтухи 67
Дикасова Е. Т. Исследование грены тутового шелкопряда, полученной от зараженных желтухой бабочек 356
Дудыкина И. В. Бутилен-гликоль и его образование в процессах брожения (Обзор). 181
Залманзон Е. С. Действие протеаз на ядерные включения при желтухе тутового шелкопряда 361
Имшенецкий А. А. Оптимальные питательные среды анаэробных целлюлозных бактерий. 215
Имшенецкий А. А. Оптимальные питательные среды для десульфурирующих бактерий 324
Имшенецкий А. А. Электронномикроскопическое изучение миксобактерий 393
Калиненко В. О. Происхождение железо-марганцевых конкреций . . 528
Коваленко Н. Н. см. Флеров А. Ф. 163
Комарова Л. И. Пипетка для выделения культур из одной клетки . . 370
Кондратьева В. см. Работнова И. Л. 509
Коновалов С. А. Питательная ценность различных азотистых соединений для дрожжей. 250
Коновалов С. А. Избирательная способность дрожжей к потреблению азота различных аминокислот 351
Кононова М. М. и Александрова И. В. Участие целлюлозных миксобактерий в процессе гумификации растительных остатков. 1. О геохимизме процесса разложения целлюлозы миксобактериями 42
Кононова М. М. Участие целлюлозных миксобактерий в процессе гумификации растительных остатков. II. О биохимизме процесса образования гуминовых кислот . . 132
Косиков К. В. Гибридизация дрожжей (Обзор). 549
Красильников Н. А. Существует ли азотобактер в лишайниках? . . 3
Красильников Н. А. Микробиологические факторы обрастания камней углекислым кальцием 128
Красильников Н. А. Микрофлора лишайников. 224
Красильников Н. А. Роль микроорганизмов в выветривании горных пород. 1. Микрофлора поверхностного слоя скальных пород . . 318
Красильников Н. А. О видовом составе актиномицетов продуцентов стрептомицина. 397
Красильников Н. А. Роль микроорганизмов в выветривании горных пород. II. Очаговое распространение микроорганизмов на поверхности скальных пород 492
Крисс А. Е. и Рукина Е. А. Микробиология Черного моря. Распространение микроорганизмов в водной толще Черного моря . . . 141
Крисс А. Е. и Рукина Е. А. О происхождении сероводорода в Черном море 332
Крисс А. Е. и Рукина Е. А. Восстановительные и окислительные процессы в сероводородной области Черного моря 402
Кузнецов С. И. Применение микробиологических методов к изучению органического вещества в водоемах 203
Любимов В. И. см. Рогинская Ц. З. 100
Макарова М. М. О новом пигментном кокке 160

Мантейфель А. Я., Богданова В. и Четверикова И. Взаимосвязь процессов конструктивного и энергетического обмена веществ у гетеротрофных бактерий. 1. Bact. formicum 118
Мардашев С. Р., Этингоф Р. Н. и Мармалевская Л. Я. О влиянии pH среды на образование декарбоксилирующих энзимов у бактерий 238
Мармалевская Л. Я. см. Мардашев С. Р. 238
Мейсель М. Н. и Уманская В. П. О механизме действия на микробную клетку четвертичных аммонийных соединений . 11
Мейсель М. Н. Строение клеток дрожжевых организмов (Обзор) . 263
Мишустин Е. Н. и Прокошев В. Н. Изменение состава почвенной микрофлоры в результате длительного применения удобрений 30
Мишустин Е. Н. и Пушкинская О. И. Микориза древесных растений и ее значение при полезащитных лесонасаждениях. (Обзор) 447
Нетте И. см. Работнова И. . . 509
Нечаева А. С. Глютатион в сушеных дрожжах. 20
Нечаева Н. Б. Два вида микобактерий, окисляющих метан 310
Новогрудский Д. М. Микоризы и степное лесоразведение. (Обзор) . 372
Новогрудский Д. М. Лишайники и целлюлозоразрушающие микроорганизмы 519
Озимов Б. В. Простой тип нефелометра для определения мутности в пробирках 366
Орлова Н. В. Образование ацетоина и 2,3-бутиленгликоля культурой Aerobacter aerogenes. 432
Осницкая Л. К. Активность культур десульфурирующих микроорганизмов, выделенных с разных глубин Черного моря 525
Пономаренко Н. И. см. Работнова И. Л. 54
Прокошев В. Н. см. Мишустин Е. Н. 30
Пушкинская О. И. см. Мишустин Е. Н 447
Работнова И. Л. и Пономаренко Н. И. Симбиотические бактерии лугового лисохвоста 54
Работнова И. Л., Попов Л. Первый исследователь сбраживания клетчатки и муравьиной кислоты. 468
Работнова И. Л., Кондратьева Е., Нетте И., Аронес С. Фиксация азота атмосферы азотобактером при различных условиях аэрации 509
Райков Б. Е., Л. С. Ценковский — основатель микробиологии в России 562
Разумов А. С. Gallionella kljasmiensis (sp. n.) как компонент бактериального планктона 442
Рогинская Ц. З. и Любимов В. И. Литические явления в культурах. Act. griseus 100
Ромакина А. В. Эпифитная микрофлора проса, перезимовавшего в поле 168
Рудаков К. И. Учение Вильямса и задачи с/х микробиологии 289
Рудаков К. И. Микроорганизмы и образование гумуса 481
Рудаков К. И. и Биркель М. Р. Развивающееся растение, микроорганизмы и прочная структура почвы 545
Рукина Е. А. см. Крисс А. Е. . . 141, 332, 402
Рунов Е. В. Распространенность стрептококкового бактериофага в сырах 174
Семенова В. А. см. Шапошников В. Н. 106
Сизова Т. П. Об устойчивости штаммов пенициллов при длительной культуре 533
Солнцева Л. И. О строении уксуснокислых бактерий 233
Стрешинский М. О. Антагонистические взаимоотношения между Pen. notatum и Bac. subtilis . . . 7
Стрешинский М. О. Стимулирующее действие пенициллиума на образование биологически-активных веществ культурой Bac. subtilis. 416
Уманская В. П. см. Мейсель М. Н. 11
Флеров А. Ф. и Коваленко Н. Н. Дрожжи некоторых плодов и ягод и их круговорот в природе 163
Федоров М. В. Фиксация молекулярного азота азотобактером в присутствии поверхностно-активных и водоотнимающих веществ . . . 299
Федоров М. В. Теория процесса фиксации молекулярного азота бактериями при участии специфического катализатора 498
Четверикова И. см. Мантейфель А. Я. 118
Шапошников В. Н. и Семенова В. А. О материальной взаимосвязи процессов энергетического и конструктивного обменов веществ у бактерий. 106
Шнейдер Ю. И. Этиология бурой (зеленой) пятнистости огурцов . . 62
Этингоф Р. Н. см. Мардашев С. Р. 238
Ярмола Г. А. Ацетоно-этиловое брожение. Сбраживание трехуглеродных соединений ацетоно-этиловыми бактериями 245
Рефераты . 82, 195, 282, 390, 470, 571
Критика и библиография 84, 198, 286, 474
Хроника 95, 199, 479

СОДЕРЖАНИЕ

К. И. Рудаков. Микроорганизмы и образование гумуса 481
Н. А. Красильников. Роль микроорганизмов в выветривании горных пород. II. Очаговое распространение микроорганизмов на поверхности скальных пород 492
М. В. Федоров. Теория процесса фиксации молекулярного азота бактериями при участии специфического катализатора 498
И. Работнова, Е. Кондратьева, И. Нетте и С. Аронес. Фиксация азота атмосферы азотобактером при различных условиях аэрации . . . 509
Д. М. Новогрудский. Лишайники и целлюлозоразрушающие микроорганизмы 519
Л. К. Осницкая. Активность культур десульфурирующих микроорганизмов, выделенных с разных глубин Черного моря. 525
В. О. Калиненко. Происхождение железо-марганцевых конкреций 528
Т. П. Сизова. Об устойчивости штаммов пенициллов при длительной культуре. 533
К. И. Рудаков и М. Р. Биркель. Развивающееся растение, микроорганизмы и прочная структура почвы 545
К. В. Косиков. Гибридизация дрожжей (Обзор) 549
Б. Е. Райков. Л. С. Ценковский — основатель микробиологии в России . . . 562
Рефераты. 571

А-13330 Подписано к печати 18.XI 1949 г. Печ. л. 6+1 вклейка
Уч.-изд. л. 9,7 Тираж 4800 экз. Заказ 2537

2-я типография Издательства Академии Наук СССР. Москва, Шубинский пер., д. 10

Цена 9 руб.

ОТКРЫТА ПОДПИСКА НА ЖУРНАЛЫ АКАДЕМИИ НАУК СССР НА 1950 ГОД

НАЗВАНИЕ ЖУРНАЛОВ	Колич. номеров в год	Подписная цена на год (в руб.)
Вестник Академии Наук СССР	12	96
Доклады Академии Наук СССР (без переплета) . .	36	360
Доклады Академии Наук СССР с 6 папками для переплета (коленкоровыми, с тиснением)	36	385
Известия Академии Наук СССР, Серия математическая	6	54
Математический сборник . .	6	90
Прикладная математика и механика	6	63
Астрономический журнал . .	6	36
Известия Академии Наук СССР, Серия физическая	6	72
Известия Академии Наук СССР, Серия географическая и геофизическая . . .	6	54
Журнал экспериментальной и теоретической физики	12	108
Журнал технической физики	12	144
Известия Академии Наук СССР, Отделение технических наук	12	180
Автоматика и телемеханика	6	45
Известия Академии Наук СССР, Отделение химических наук	6	63
Журнал общей химии	12	180
Успехи химии	6	48
Журнал физической химии	12	144
Журнал прикладной химии	12	126
Биохимия	6	54
Журнал аналитической химии	6	36
Коллоидный журнал	6	45
Известия Академии Наук СССР, Серия геологическая	6	90
Записки Всесоюзного минералогического общества . .	4	30
Известия Всесоюзного географического общества . . .	6	63
Почвоведение	12	72
Известия Академии Наук СССР, Серия биологическая	6	72
Журнал общей биологии . .	6	45
Успехи современной биологии	6	60
Ботанический журнал . . .	6	63
Зоологический журнал . . .	6	54
Микробиология	6	54
Физиологический журнал СССР имени Сеченова . .	6	72
Известия Академии Наук СССР, Серия истории и философии	6	54
Известия Академии Наук СССР, Отделение экономики и права	6	45
Советская этнография . . .	4	90
Вестник древней истории . .	4	120
Известия Академии Наук СССР, Отделение литературы и языка	6	54
Советское государство и право	12	108
Природа	12	72

Подписка принимается:

В городских (районных) отделах «Союзпечати», во всех почтовых отделениях, а также конторой «Академкнига» *Москва*, Пушкинская 23, и книжными магазинами «Академкниги»:

Москва, ул. Горького 6, *Ленинград*, Литейный проспект 53-а, *Свердловск*, ул. Белинского 71-в, *Ташкент*, ул. К. Маркса, 29, *Киев*, Б. Владимирская, 53.